



**Studien zur Aufklärung des Funktionsmechanismus der
Akrosomenreaktion in Spermien:
Das Multi-PDZ-Domänen Protein MUPP1 als molekularer
Organisator beteiligter Signaltransduktionsmoleküle**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

dem

Fachbereich Biologie
vorgelegt von

Frauke Ackermann
aus Hanau

Marburg/Lahn 2008

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dis-
sertation am angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. U. Homberg

Zweitgutachter: PD Dr. I. Boekhoff

Tag der mündlichen Prüfung am:

Für meine Eltern, Ilka und Kaja

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Aufbau und Funktion eines Spermiums	3
2.1.1	Kompartimentierung einer Spermienzelle	3
2.1.2	Aufgaben eines Spermiums	5
2.2	Molekulare Prozesse während der Akrosomenreaktion	8
2.3	Aufbau und Organisation von zellulären Signalkaskaden	16
2.3.1	<i>Lipid rafts</i> als Organisatoren von Signaltransduktionskaskaden	16
2.3.2	Signalkomplexe werden mit Hilfe von PDZ-Domänen Prote- inen organisiert	18
2.4	Ziel der Arbeit	21
3	Materialien	23
3.1	Chemikalien	23
3.2	Puffer, Medien, Agarplatten und Antibiotika	26
3.3	Gebrauchswaren	30
3.4	Geräte	31
3.5	Antikörper	32
3.5.1	Primärantikörper	32
3.5.2	Sekundärantikörper	33
3.6	Enzyme, Kits und Größenstandards	33
3.7	Primer	34
3.8	Plasmide	35
3.9	Bakterienstämme	35
3.10	Versuchstiere	35

4	Methoden	36
4.1	Tierhaltung	36
4.2	Molekularbiologische Methoden	36
4.2.1	Isolierung von RNA aus Geweben	36
4.2.2	Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA	37
4.2.3	Reverse Transkription mit anschließender Polymeraseketten- reaktion (RT-PCR)	37
4.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	38
4.2.5	Agarose-Gel-Elektrophorese	39
4.2.6	Isolierung von DNA aus einem Agarosegel	40
4.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten	41
4.2.8	Ligation eines PCR-Fragments in einen Klonierungsvektor .	42
4.2.9	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	43
4.2.10	Transformation chemisch kompetenter <i>E.Coli</i> Zellen	43
4.2.11	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> Zellen mittels al- kalischer Lyse	44
4.2.12	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E-coli</i> Zellen im präpa- rativen Maßstab	45
4.2.13	Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA	45
4.3	GST-Fusionsproteine	46
4.3.1	Expression von GST-Fusionsproteinen	46
4.3.2	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	47
4.3.3	<i>In vitro</i> -Bindungs Assay (GST pull-down)	48
4.4	Hefe Methoden	50
4.4.1	Das Hefe-Zwei-Hybrid-System	50
4.4.2	Transformation von Hefezellen	52
4.4.3	Hefe Verpaarung (<i>mating</i>)	53
4.4.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe	54
4.4.5	Analyse der identifizierten Hefeklone mit Hilfe einer PCR Strategie	55
4.5	Proteinbiochemische Methoden	56
4.5.1	Präparation von Membran - und cytosolischen Proteinfrak- tionen	56

4.5.2	Isolation von <i>detergent-insoluble glycolipid-enriched membrane complexes</i> DIGs	56
4.5.3	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford	58
4.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
4.5.5	Westernblot-Technik	61
4.5.6	Immunodetektion	62
4.5.7	Coomassie-Färbung von Proteingelen	63
4.6	Immuncytochemische Untersuchungen an Spermien	63
4.6.1	Herstellung von Spermienpräparaten für die Mikroskopie . .	63
4.6.2	Indirekte immuncytochemische Färbungen	64
4.7	Funktionelle Untersuchungen zur Calcium vermittelten acrosomalen Exocytose an Mausspermien	65
4.7.1	Streptolysin O (SLO) Ansatz	65
4.7.2	Sequestrierung des akrosomalen Calciums durch den Lichtsensitiven Calcium-Chelator NP-EGTA-AM	68
5	Ergebnisse	71
5.1	Analysen zur funktionellen Rolle von MUPP1 in Spermien	71
5.1.1	MUPP1 ist im Bereich des Akrosoms von Spermien lokalisiert	71
5.1.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von MUPP1	74
5.1.3	Das Adapterprotein MUPP1 ist funktionell an der akrosomalen Exocytose beteiligt	75
5.1.4	MUPP1 ist funktionell an den einleitenden Prozessen der Akrosomenreaktion beteiligt	81
5.1.5	MUPP1 ist mit <i>detergent-insoluble glycolipid-enriched membrane complexes</i> (DIGs) in Spermien der Ratte assoziiert . .	86
5.2	Identifikation von potentiellen Interaktionspartnern von MUPP1 . .	90
5.2.1	Befunde eines Hefe-Zwei-Hybrid-Screens	90
5.2.2	Die Calcium/Calmodulin abhängige Proteinkinase II ist im Akrosom von Spermien verschiedener Säugerspezies lokalisiert	93
5.2.3	Die CaMKII ist mit DIGs assoziiert	96

5.2.4	Die CaMKII als ein Interaktionspartner für das Adapterprotein MUPP1	98
5.3	Analysen zur funktionellen Rolle der CaMKII während der akrosomalen Exocytose in Mausspermien	100
5.3.1	Der Calmodulin Antagonist W7 potenziert die spontane akrosomale Sekretionsrate in Mausspermien	100
5.4	Der CaMKII Inhibitor KN93 hat einen potenzierenden Effekt auf die spontane Akrosomenreaktionsrate in Mausspermien	101
6	Diskussion	105
A	Abkürzungen	142
B	Danksagung	146
C	Lebenslauf	148
D	Eidesstattliche Erklärung	149

1 Zusammenfassung

Die Akrosomenreaktion in Spermien ist eine spezielle Form der Calcium-regulierten Exocytose in somatischen Zellen. Ausgelöst durch die Bindung des Spermiums an die Zona pellucida der Eizelle verschmilzt das mit hydrolysierenden Enzymen gefüllte akrosomale Vesikel an mehreren Kontaktstellen mit der Plasmamembran der männlichen Keimzelle, wodurch es zur Bildung einer Vielzahl von Pseudovesikeln und damit zur Freisetzung der akrosomalen Enzyme kommt. Bei diesem Prozess kann man zwei sequentielle und funktionell-gekoppelte Reaktionen unterscheiden: Durch den Kontakt des Spermiums mit der Zona pellucida wird zuerst ein kurzes Calcium-Signal ausgelöst, das die initialen Reaktionen der Vesikel-Anlagerung und Verankerung vermittelt. Anschließend wird durch das zeitlich-verzögerte aus dem Akrosom freigesetzte Calcium der finale Prozess der Fusionsporenbildung katalysiert. In jüngster Zeit hat sich gezeigt, dass die akrosomalen Sekretionsprozesse wie bei der Calcium-regulierten Exocytose in Neuronen durch die SNARE-Fusionsmaschinerie vermittelt werden. Jedoch sind die zugrunde liegenden molekularen Reaktionen und speziell die Mechanismen, die eine simultane Ausbildung einer Vielzahl von Fusionsporen entlang der Plasmamembran ermöglichen, gleichzeitig aber eine unbeabsichtigte Exocytosereaktion verhindern, noch weitgehend unverstanden. Im Rahmen meiner Doktorarbeit konnte ich zeigen, dass das Adapterprotein Multi-PDZ-Domänen Protein (MUPP1) in Spermien lediglich im Bereich des Akrosoms und dort entlang der akrosomalen Membran und der Plasmamembran lokalisiert ist. Damit scheint MUPP1 ein vielversprechender Kandidat, um mit Hilfe seiner 13 modular aufgebauten PDZ-Proteininteraktionsmotive eine Art Proteinnetzwerk unterhalb der Plasmamembran auszubilden. Mit diesem könnte durch Interaktion mit distinkten Signalmolekülen der sequentiell-verlaufenden akrosomalen Exocytose die simultane Bildung der zahlreichen Fusionsporen sichergestellt werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, habe ich unter-

sucht, ob MUPP1 an der Akrosomenreaktion funktionell beteiligt ist. Da Spermatozoen genetischen Methoden wie siRNA-Verfahren nicht zugänglich sind, habe ich kapazitierte und mit Streptolysin O permeabilisierte Spermien mit spezifischen Antikörpern gegen MUPP1 inkubiert. Die Resultate dieser Studien zeigen, dass die verwendeten Antikörper gegen das MUPP1-Protein in allen Fällen die Akrosomenreaktion signifikant inhibierten. Weiterführende funktionelle Stimulierungsexperimente, in denen das akrosomale Calcium mit einem UV-sensitiven Calcium-Chelator komplexiert wurde, haben darüber hinaus gezeigt, dass MUPP1 an den frühen Phasen der Erkennung der Zona pellucida und/oder der Vesikel-Anlagerung beteiligt ist, aber keine funktionelle Rolle beim Verschmelzungsprozess selbst übernimmt. Zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner von MUPP1 in Spermien habe ich u. a. die Hefe-Zwei-Hybrid-Technik verwendet. Dabei konnte ich eine Vielzahl von möglichen Interaktionspartnern des MUPP1 aus cDNA des Hodens der Maus identifizieren, wobei ich das PDZ-Domänen Protein glutamate receptor interacting protein (GRIP1) zunächst für einen vielversprechenden Kandidaten gehalten habe, da es in Spermien einen supramolekularen Komplex mit der Phospholipase 4, einem Schlüsselenzym der akrosomalen Exocytose, bildet. Mit Hilfe verschiedener Fluoreszenz-technischer Nachweisverfahren konnte GRIP1 allerdings lediglich im Flagellum von Mausspermien nachgewiesen werden und kommt damit als physiologischer Bindungspartner für MUPP1 nicht in Betracht. Mit der Calcium/Calmodulin Kinase II (CaMKII) konnte ich jedoch einen MUPP1 Bindungspartner identifizieren, der nicht nur im Akrosom lokalisiert, sondern ähnlich wie MUPP1 auch, in Detergenz-unlöslichen Membranmikrodomänen, den *lipid rafts*, konzentriert ist. Funktionelle Stimulierungsexperimente zeigten darüber hinaus, dass eine spezifische Blockierung der CaMKII zu einer Potenzierung der spontanen Akrosomenreaktionsrate führte. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die Kinase in Form eines *Clamps* eine ungewollte Akrosomenreaktion unterbindet. Eine anschließende Behandlung der Spermien mit Calcium und Calmodulin löste die MUPP1-CaMKII Bindung und kann so offenbar zur Aufhebung des Fusions-*Clamps* führen.

2 Einleitung

2.1 Aufbau und Funktion eines Spermiums

2.1.1 Kompartimentierung einer Spermienzelle

Das Spermium ist eine spezialisierte Zelle, die wegen ihrer Aufgaben während der Befruchtung einen charakteristischen Aufbau besitzt, der sie von anderen Körperzellen wesentlich unterscheidet. Im Weiteren wird der Aufbau einer Spermienzelle sowie deren physiologischen Aufgaben kurz beschrieben.

Ein zentrales morphologisches Charakteristikum der Spermien ist, dass reife Spermien grundsätzlich aus zwei räumlich getrennten Kompartimenten, dem Kopf und dem Schwanz bestehen (s. Abb. 2.1). Der Schwanz, das Flagellum, ist ein geißelartiger Fortsatz, den die Keimzelle benötigt, um im Eileiter die relativ große Distanz bis zur Eizelle im Eileiter zurückzulegen. Das Flagellum von Säugerspermien ist in drei Abschnitte unterteilt: Das Mittelstück (*midpiece*) mit den Energie-liefernden Mitochondrien, das Hauptstück (*principle piece*), das zusammen mit dem Mittelstück eine fädige Struktur, das Axonem besitzt (Inaba, 2007) und das Endstück, in dem keine Mikrotubuli mehr vorhanden sind (Inaba, 2003) (s. Abb. 2.1). Das zweite Kompartiment ist der Kopf, der aus dem Zellkern, dem Cytoplasma und einem großen Vesikel, dem sogenannten Akrosom, besteht (Pesch and Bergmann, 2006) (s. Abb 2.1). Dieses akrosomale Vesikel, das bereits während des Reifungsprozesses in den Vorläuferzellen durch die Fusion einzelner, aus dem Golgi-Apparat abgeschnürter kleiner Vesikel entsteht (Kierszenbaum and Tres, 2004), ist mit hydrolysierenden Enzymen gefüllt, die sowohl Proteine als auch komplexe Zucker spalten können (Tulsiani et al., 1998). Sie werden beim ersten Kontakt des Spermiums mit der Eizelle durch die Akrosomenreaktion freigesetzt. Die ausgeschütteten Enzyme verdauen dann die im Wesentlichen aus Glykoproteinen bestehende Hülle

der Oocyte, die sogenannte Zona pellucida. Erst dadurch wird es dem Spermium möglich, in direkten Kontakt mit der Plasmamembran der Eizelle zu gelangen (Breitbart, 2002a).

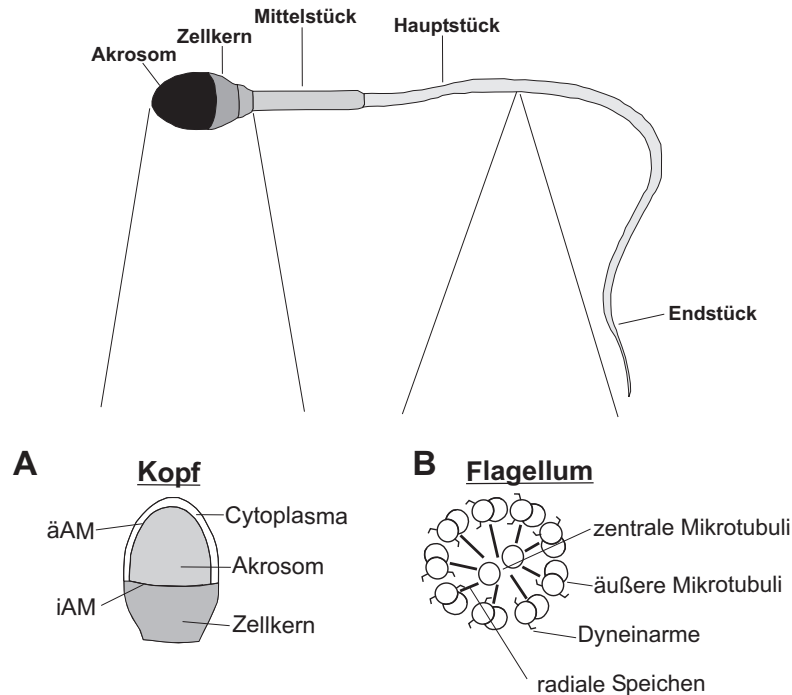


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau eines Spermiums.

Ein Spermium besteht morphologisch aus zwei Abschnitten, dem Kopfbereich und dem langen Flagellum. **[A]** Der Kopf des Spermiums besteht aus dem Zellkern mit einem haploiden Chromosomensatz und dem akrosomalen Vesikel. Die dem Zellkern zugewandte Membran wird dabei als innere Akrosomenmembran (iAM) bezeichnet; die an die Plasmamembran angrenzende Membran als äußere Akrosomenmembran (äAM).

[B] Der Schwanz besteht aus drei Segmenten, Mittelstück, Hauptstück und Endstück. Das Mittelstück ist etwas verbreitert; in ihm befinden sich dicht gepackte Mitochondrien, die die Energie in Form von ATP für den Schwanzschlag liefern. Das Flagellum des Spermiums wird mit Ausnahme des Endstückes vom Axonem durchzogen, das die typische $9 + 2$ Struktur der Mikrotubuli aufweist. Dabei werden zwei einzelne, zentrale Mikrotubuli von einem äußeren Ring aus je neun paarigen Mikrotubuli umgeben. An den Mikrotubuli greifen Dyneinköpfe an, über deren ATP-verbrauchendes Abknicken das Aneinander-Vorbeigleiten der Mikrotubuli und somit der Schwanzschlag des Spermiums ermöglicht wird.

2.1.2 Aufgaben eines Spermiums

Nach der Ejakulation in die Vagina bis hin zu einer erfolgreichen Befruchtung der Eizelle im Eileiter muss ein Spermium nacheinander mehrere Prozesse durchlaufen. Eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Befruchtung ist dabei die Kapazitation (s. Abb. 2.2), die eine funktionelle Reifung des Spermiums darstellt (AUSTIN, 1952). Als Kapazitation werden alle Veränderungen zusammengefasst, die ein Spermium nach der Ejakulation im weiblichen Reproduktionstrakt durchläuft und die zu einer Veränderung der molekularen Zusammensetzung und der physiologischen Eigenschaften der Spermatozoen-Membran beitragen (Rathi et al., 2001)(Salicioni et al., 2007). Dazu gehören u. a. die Umverteilung von Membranproteinen, der Verlust von Cholesterol aus der Membran sowie die Phosphorylierung verschiedener Signalproteine; außerdem werden die Spermien hyperaktiv, sie zeichnen sich durch eine ausladende, Peitschenartig-schlagende Bewegung (Hyperflagellation) des Schwanzes aus (Yanagimachi, 1994). Die Kapazitation wird durch eine durch Bicarbonat (HCO_3^-) aktivierte lösliche Adenylatcyklase (Harrison and Miller, 2000), die erst im Eileiter durch die im Vergleich zum Nebenhoden relativ hohe Bicarbonatkonzentration stimuliert wird (Rodriguez-Martinez et al., 1990), ausgelöst. Das dabei gebildete cAMP kann dann über die Aktivierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) unter anderem die Phosphorylierung verschiedener Signalproteine katalysieren (Jha et al., 2003).

Nach dieser sekundären Reifung, die fast ausschließlich im zum Uterus gelegenen Isthmus-Abschnitt des Eileiters stattfindet, müssen die Spermien bis zur Eizelle, die sich im trichterförmigen Ampullen-Abschnitt am Ende des Oviductes befindet, eine relativ lange Wegstrecke zurück legen. Um sich im Eileiter zu orientieren benutzt das Spermium offenbar zwei unterschiedliche Navigationsstrategien (Eisenbach and Giojalas, 2006). Auf dem Weg vom Reifungsort im Isthmus bis zur Region der Befruchtung in der Ampulle benutzen die Spermien die Thermotaxis (s. Abb. 2.2(1)). Hinweise dafür sind u. a. ein gemessener Temperaturunterschied von ca. 2 °C zwischen Isthmus und Ampulle des Eileiters (Bahat and Eisenbach, 2006) und der Befund, dass vollständig kapazitierte humane Spermien in der Lage sind, kleine Temperaturunterschiede zu registrieren und sich darauf gerichtet vorwärts zu bewegen (Bahat et al., 2003). Wodurch dieser Prozess der Thermo-

taxis bei Spermien auf molekularer Ebene vermittelt wird, ist bis heute allerdings noch weitestgehend unverstanden. Molekulare Temperatursensoren, die in anderen Zellsystemen häufig an der Detektion von Temperaturunterschieden beteiligt sind, sind Vertreter der TRP (*transient receptor potential*) Familie (Patapoutian, 2005) (Latorre et al., 2007). Tatsächlich konnte die Expression einzelner Mitglieder dieser großen Kanal-Familie wie z. B. der TRPC2, der TRPC1, und der TRPC3 im Flagellum und im Kopfbereich von Säugerspermien nachgewiesen werden (Jungnickel et al., 2001)(Trevino et al., 2001). Wie eine temperatur-induzierte Kanalaktivierung in den Spermien in Bewegung übersetzt wird, ist allerdings bisher noch nicht verstanden.

Nachdem die Spermien die Eizelle in der Ampulle erreicht haben, orientieren sie sich chemotaktisch gerichtet im Gradienten einer chemoattraktiven Substanz (Eisenbach and Tur-Kaspa, 1999) (s. Abb. 2.2(1)). Es wird angenommen, dass die chemoattraktiven Lockstoffe entweder von der Oocyte und/oder von den die Eizelle umgebenden Kumuluszellen sezerniert werden (Eisenbach and Giojalas, 2006) (Oren-Benaroya et al., 2008). Der folgende Abschnitt fasst kurz die wichtigsten physiko-chemischen Eigenschaften dieser Signallockstoffe und ihrer in Spermien exprimierten Erkennungsmoleküle zusammen.

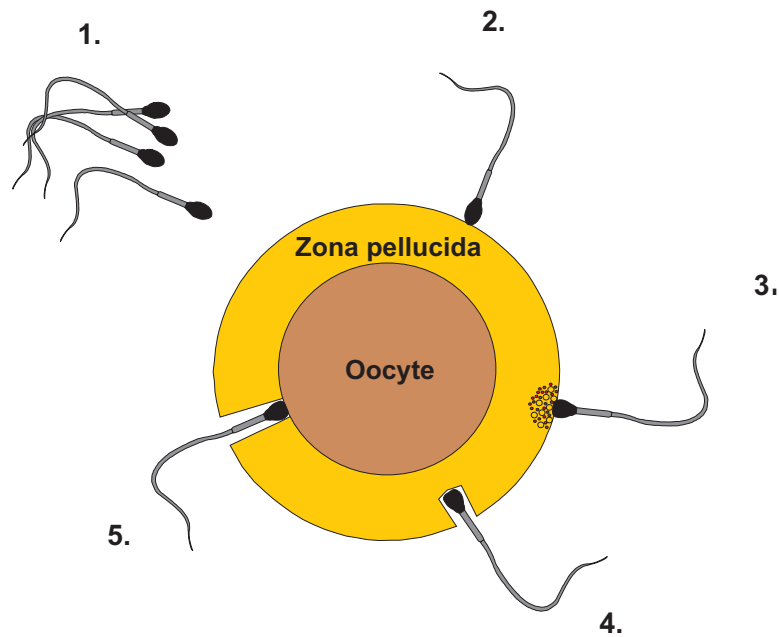
Es wird zum einen diskutiert, dass Rezeptoren für Odorantien, die gewöhnlich im olfaktorischen Epithel der Nase exprimiert werden (Buck and Axel, 1991), als Rezeptoren für chemoattraktive Stoffe in Spermien in Betracht kommen. Diese Vermutung wird u. a. dadurch gestützt, dass der in humanen Spermien exprimierte hOR17-4 nach Aktivierung durch den synthetischen Maiglöckchenduft Bourgeonal eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration sowie der Schwanzschlagfrequenz induziert (Spehr et al., 2003). Eine vergleichbare Reaktion auf Geruchsstoffe ist in Spermien der Maus beobachtet worden. Sie reagieren auf den Geruchsstoff Lyrall ebenfalls mit einer Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration und schwimmen gerichtet auf hohe Lyralkonzentrationen zu (Fukuda et al., 2004).

Zum anderen wird diskutiert, dass das Steroidhormon Progesteron als chemoattraktiver Lockstoff wirkt. Es wird von den die Oocyte umgebenden Kumuluszellen sezerniert (Correia et al., 2007) und stellt schon in picomolaren Konzentrationen für humane Spermien eine chemoattraktive Substanz dar (Oren-Benaroya et al.,

2008). Außerdem ist für das als *regulated upon activation normal T cell expressed and secreted* (Rantes) bezeichnete Chemokin eine chemoattraktive Wirkung auf humane Spermien beschrieben worden (Isobe et al., 2002). Die entsprechenden Cytokin-Rezeptoren CCR3 und CCR5 sind bereits in menschlichen Spermien nachgewiesen worden (Muciaccia et al., 2005) (Tüzün et al., 2007). Die molekularen Transduktionsprozesse, die dieser Art von Chemotaxis zugrunde liegen könnten, sind auch für diese Rezeptoren noch nicht bekannt und Gegenstand der aktuellen Forschung.

Nachdem das Spermium die reife Eizelle in der Ampulle erreicht hat muss es vor der eigentlichen Befruchtung zunächst die Oberfläche der Oocyte erkennen und binden (s. Abb. 2.2(2)). Diese ist allerdings von einer Hülle, der sogenannten Zona pellucida, umgeben (Clark and Dell, 2006), die bei Eizellen der Maus hauptsächlich aus den drei sulfonisierten Glykoproteinen ZP1, ZP2 und ZP3 besteht (Bleil and Wassarman, 1980), wobei ZP2 und ZP3 Dimere bilden, die über ZP1 quervernetzt sind (Greve and Wassarman, 1985). Die eigentliche Bindung des Spermiums an die Oocyte wird offenbar über das Glykoprotein ZP3 vermittelt, das als Ligand von dem Spermium erkannt wird, und das Signal zur Auslösung der Akrosomenreaktion darstellt (Vazquez et al., 1989). Für das Glykoprotein ZP2 wird dagegen vermutet, dass es als sekundärer Ligand für die spätere Interaktion zwischen Eizelle und Spermium notwendig ist. Durch das Binden an die innere akrosomale Membran des Spermiums kann es den direkten Kontakt zwischen Oocyte und männlicher Keimzelle nach der Akrosomenreaktion herstellen (Bleil et al., 1988).

Den ZP-Proteinen kommt somit eine essentielle Rolle für den Fusionsprozess zu. Die Rezeptoren der Spermien für die Glykoproteine der Zona pellucida konnten bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden (Gupta et al., 2007). Für das ZP3, dessen Rezeptor möglicherweise eine Lektin-ähnliche Affinität besitzt (Rodeheffer and Shur, 2004), werden als potentielle Kandidaten die β -1,4-Galaktosyltransferase (Shur and Hall, 1982)(Lopez et al., 1985), das sp56 (Cheng et al., 1994), die α - Mannosidase (Cornwall et al., 1991) und das Zonadhesin (Gao and Garbers, 1998) diskutiert.



modifiziert nach Kaupp

Abbildung 2.2: Aufgaben eines Spermiums.

Nach der Ejakulation müssen die Spermien im weiblichen Genitaltrakt bis zur Befruchtung der Oocyte eine Reihe von aufeinander folgenden Prozessen durchlaufen.

Nach der Freisetzung im weiblichen Genitaltrakt machen die Spermien einen Reifungsprozess durch, die Kapazitation, die mit einer Vielzahl physiologischer Veränderungen der Zelle einhergeht und es dem reifen Spermium ermöglicht, die Oocyte im Oviduct aufzufinden (1). An der Eizelle binden die Spermien dann an die aus Glykoproteinen bestehende Zona pellucida (2), wodurch die Akrosomenreaktion ausgelöst wird (3). Während dieser Exocytose werden hydrolysierende Enzyme aus dem Akrosom freigesetzt (4). Den finalen Prozess der Befruchtung stellt anschließend die Verschmelzung der Plasmamembran der Eizelle mit der inneren akrosomalen Membran des Spermiums dar (5).

2.2 Molekulare Prozesse während der Akrosomenreaktion

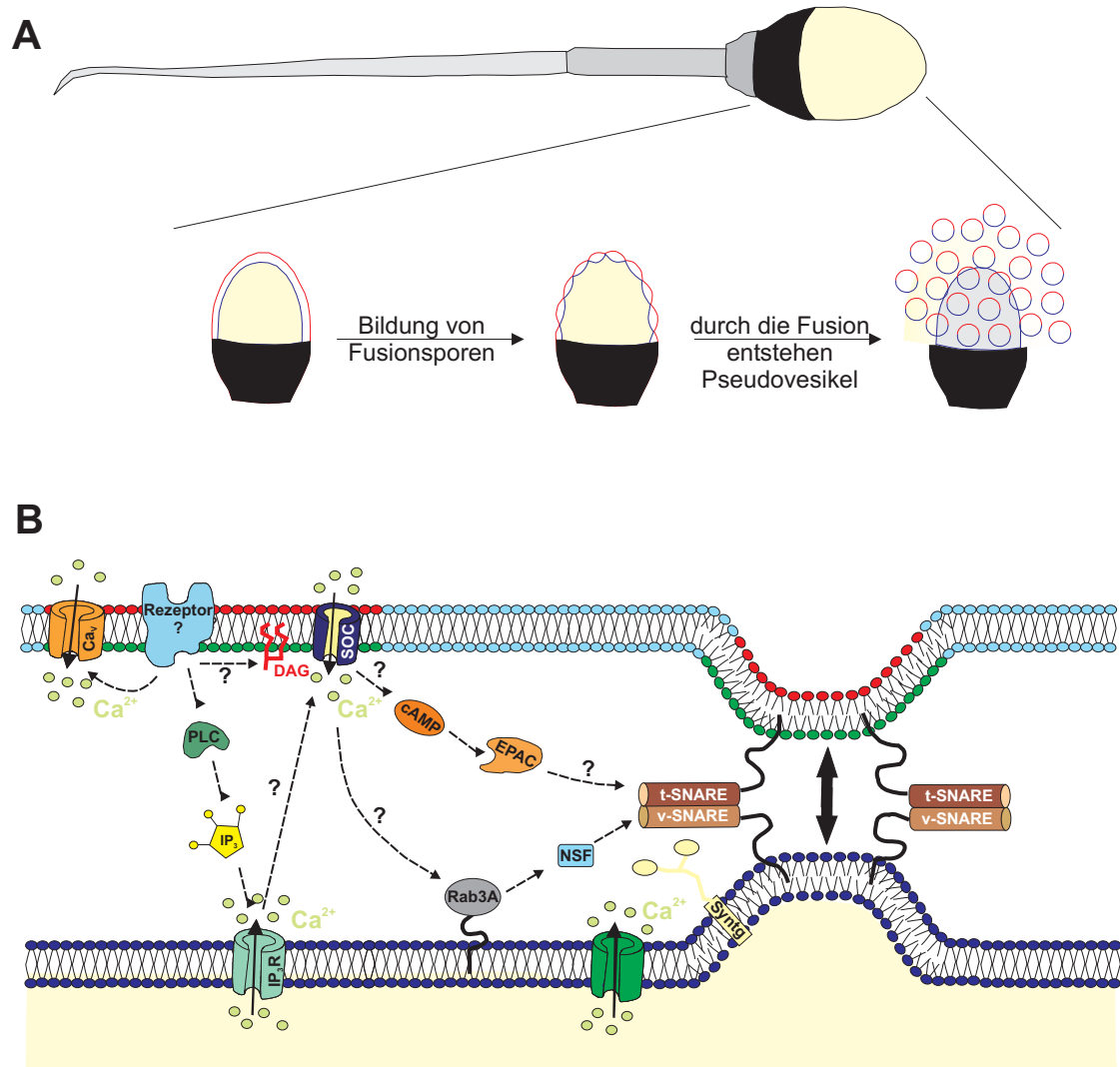
Die Akrosomenreaktion ist ein exocytotischer Prozess, bei dem die äußere akrosomale Membran mit der darüberliegenden Plasmamembran fusioniert, so dass es über die Entstehung einer Vielzahl von Pseudovesikeln zu einer Durchlöcherung, also einer Fenestrierung der Akrosomenmembran und dabei zur Freisetzung der hydrolysierenden Enzyme kommt (Breitbart, 2003) (s. Abb. 2.3). Dieser Fusions-

prozess wird durch den direkten Kontakt des Spermiums mit dem Glykoprotein ZP3 der Zona pellucida ausgelöst (Wassarman et al., 2005). Die molekulare Identität des/der Rezeptoren (Gupta et al., 2007) sowie die molekularen Prozesse der Membranverschmelzung sind bis heute nur ansatzweise verstanden. In den letzten Jahren konnte partiell aufgeklärt werden, dass die akrosomale Exocytose offenbar eine spezielle Form der Calcium-regulierten Exocytose in somatischen Zellen darstellt (Jahn, 2004) (Mayorga et al., 2007). Die Akrosomenreaktion wird im Gegensatz zur Calcium-regulierten Exocytose, durch mindestens drei zeitlich nacheinander aktivierte Typen von Calcium-Kanälen ausgelöst (Darszon et al., 2005) (Florman et al., 2008): Das erste sehr schnelle Calcium-Signal, das bereits 50 ms nach dem ersten Kontakt des Spermiums mit dem ZP3-Protein ausgelöst wird (Darszon et al., 2006), wird durch die Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle vermittelt (Darszon et al., 2006). Der Aktivierungsmechanismus der beteiligten Calciumkanäle konnte bisher aber noch nicht aufgeklärt werden (Darszon et al., 2006) (Florman et al., 2008) (s. Abb. 2.3). Zeitlich verzögert kommt es dann zu einer sehr viel langsameren mehrere Minuten anhaltenden Calcium-Antwort, die auf zwei überlappenden Calcium-Signalen beruht: Eine ZP3-vermittelte Phospholipase δ 4-Stimulierung bewirkt eine Hydrolyse des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in die sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) (Fukami et al., 2001) (Fukami et al., 2003). Das gebildete IP_3 verursacht dann eine sekundäre Freisetzung von Calcium aus dem Akrosom, das wie das Endoplasmatische Retikulum in somatischen Zellen (Berridge, 2007) als intrazellulärer Calciumspeicher fungiert (Blas et al., 2002) (Herrick et al., 2005) (s. Abb. 2.3). IP_3 -Rezeptoren wurden schon vor geraumer Zeit in der akrosomalen Membran von Spermien nachgewiesen werden (Walensky and Snyder, 1995). Zudem löst sowohl Thapsigargin, ein Inhibitor für die Calcium-ATPase (Thastrup et al., 1989), als auch Thimerosal, ein Agonist für den IP_3 -Rezeptor (Bultynck et al., 2004), in der Abwesenheit von extrazellulärem Calcium eine Akrosomenreaktion aus (Herrick et al., 2005). Der dritte Typ der beteiligten Calciumkanäle ist ein durch das akrosomale Calcium aktivierter Speicher-aktivierter Calciumkanal (*store-operated*), der vermutlich zu den Ionenkanälen der TRP-Kanalfamilie gehört (Jungnickel et al., 2001) und einen langanhaltenden Calciumeinstrom in die Zelle bewirkt der letztendlich die finale Ausbildung der Fusi-

onspore auslöst (s. Abb. 2.3). Bezüglich der molekularen Mechanismen der eigentlichen Verschmelzungsprozesse zwischen äußerer Akrosomenmembran und Plasmamembran des Spermiums zeigen speziell Studien mit permeabilisierten Spermien und inhibitorisch-wirkenden Antikörpern, dass die akrosomale Exocytose analog der vesikulären Exocytose (Rothman, 1994) und der regulierten Neurosekretion (Jahn and Südhof, 1999) über die SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*)-Fusionsmaschinerie erfolgt (Mayorga et al., 2007) (Tomes, 2007).

Im folgenden Abschnitt wird versucht, die Prinzipien der Calcium-regulierten Exocytose durch die SNARE-Proteine am Beispiel der Freisetzung von Neurotransmittern an chemischen Synapsen zusammenzufassen. Die exocytotische Freisetzung von Transmittern wird durch Mitglieder der SNARE-Proteinfamilie vermittelt, die sich alle durch ein cytosolisches ca. 60 - 70 AS langes SNARE-Motiv auszeichnen (Söllner et al., 1993). Dabei lagern sich die SNARE-Proteine Syntaxin, SNAP 25 (t [target]-SNARE) und Synaptobrevin (v [vesikulär]-SNARE) über die SNARE-Motive zu einem Komplex zusammen, wodurch die gegenüberliegenden Membranen einander so stark angenähert werden, dass ein teilweise fusioniertes Membranintermediat entsteht (Jahn, 2004) (s. Abb 2.4). Die Fusion läuft *in vivo* viel schneller ab als bisher in *in vitro* nachvollzogen werden konnte (Brunger, 2001), daher wird vermutet, dass zusätzliche Regulatorproteine die SNARE-Komplexbildung stufenweise steuern.

Zunächst muss das Vesikel an eine bestimmte Region innerhalb der Cytomatrix der aktiven Zone entlang der Präsynapse angenähert werden (*tethering*) (Schoch and Gundelfinger, 2006) (s. Abb 2.4). Dies wird durch große multimere Proteinkomplexe (z. B. Exocyst) vermittelt, die entweder *coiled-coil* Proteine oder multimere Proteininteraktionseinheiten darstellen (Whyte and Munro, 2002) (Kümmel and Heinemann, 2008) (Grosshans et al., 2006) (Cai et al., 2007). Nachdem die Vesikel mit Hilfe der *tethering*-Faktoren gezielt an ihre Fusionsstelle gebracht wurden, müssen sie in einem nächsten Schritt an eine bestimmte Region der Plasmamembran angeheftet (*docking*) werden (s. Abb 2.4). An diesem Prozess sind eine Reihe von Regulatorproteinen beteiligt, wie die monomere Rab GTPase, das *Rab interacting molecule* (RIM) sowie die cytosolischen Regulatorproteine Munc13 and Sec1/Munc18 (SM). Sie vermitteln in einem komplexen Zusammenspiel die Ver-



ankerung des Vesikels an seinem Fusionsort. Dabei interagiert die GTPase Rab3, die in ihrer GTP-gebundenen Form über eine Lipidmodifikation in der Vesikelmembran verankert ist (Johnston et al., 1991), mit den Effektorproteinen RIM1 und RIM2 (Wang et al., 2001), die Bestandteil der aktiven Zone an der Präsynapse sind (Sudhof, 2004). Dadurch wird das Vesikel innerhalb der aktiven Zone verankert (s. Abb 2.4). Das Anheften (*docking*) wird zusätzlich durch ein Mitglied der Sec/Munc Familie, dem Munc18 unterstützt (Toonen, 2003), indem dieses das Vesikel über die Interaktion mit vesikulären Proteinen wie dem DOC2 (Verhage et al., 1997) und plasmamembranständigen Proteinen wie Mint (Okamoto and Südhof, 1997) und Syntaxin (Hata et al., 1993) an die Plasmamembran rekrutiert. Durch die Munc18-Syntaxin Interaktion wird das SNARE-Motiv des Syntaxins für eine Interaktion mit den übrigen SNARE Proteinen wie SNAP25 und Synaptobrevin nicht zugänglich, so dass kein intermediärer SNARE-Komplex gebildet werden kann (Dulubova et al., 1999) (Gulyás-Kovács et al., 2007). Für die Bildung eines fusionskompetenten SNARE-Komplexes muss das Vesikel nach dem Anheften noch einen Reifungsprozess (*priming*) durchlaufen (Klenchin and Martin, 2000), der zum Aufbau des aktiven trimeren SNARE-Komplexes führt (Becherer and Rettig, 2006) (s. Abb 2.4). Ein essentieller Faktor ist dabei ein Mitglied der unc13/Munc13 Familie, das Munc13 (Betz et al., 2001). Es wird durch

Abbildung 2.3: Molekulare Prozesse während der Akrosomenreaktion. **[A]** Die Akrosomenreaktion ist ein exocytotischer Prozess bei dem die äußere akrosomale Membran gleichzeitig an vielen Kontaktstellen mit der Plasmamembran fusioniert. Durch die Verschmelzung der beiden Membranen entstehen Pseudovesikel, wobei der akrosomale Inhalt freigesetzt wird. **[B]** Induziert durch die Bindung an das Glykoprotein ZP3, das ein Bestandteil der Zona pellucida der Eizelle ist, kommt es zu drei zeitlich aufeinander folgenden Calciueinströmen ins Cytoplasma des Spermiums, wodurch die Akrosomenreaktion ausgelöst wird: Zunächst werden durch die Depolarisation der Plasmamembran Spannungs-abhängige Calcium-Kanäle geöffnet, so dass es zu einer schnellen kurzfristigen Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration kommt. Neben der Depolarisation der Plasmamembran kommt es zur Aktivierung einer Phospholipase C (PLC), die wiederum die sekundären Botenstoffe DAG und IP₃ katalysiert. Freies IP₃ bindet dann an den IP₃-Rezeptor in der Membran des Calcium-speichernden Akrosoms, wodurch es zum Calciumausstrom aus dem Akrosom und zur Aktivierung von Speicher-gesteuerten Kanälen der TRP-Familie in der Plasmamembran der Zelle kommt (Jungnickel et al., 2001). Deren Öffnung löst die zweite Phase des langanhaltenden Calciums-Signals aus, das dann über nachgeschaltete Regulatorproteine wie die GTPase Rab3A und die ATPas NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) die finalen Prozesse der Membranfusion vermittelt.

die Interaktion mit RIM1 und der dadurch verbundenen Verdrängung von Rab3 aus dem RIM-Komplex in der aktiven Zone verankert (Betz et al., 2001). Dort stabilisiert es eine offene Konformation des Syntaxins und ermöglicht damit die Bildung des trimeren SNARE-Komplexes, indem es Munc18 aus der Bindung mit Syntaxin verdrängt (Brose et al., 2000)(Sassa et al., 1999). Syntaxin kann dann seine offene Konformation annehmen und die weiteren SNARE-Proteine binden. Nur Vesikel, die über so einen trimeren SNARE-Komplex mit der Plasmamembran verbunden sind, können nach einem Calcium-Stimulus fusionieren. Dabei fungiert das vesikuläre Synaptotagmin als Calcium-Sensor (Chapman, 2008) (Martens and McMahon, 2008). Synaptotagmin besteht aus einer Transmembrandomäne, einer kurzen intraluminalen Domäne und einer großen cytoplasmatischen Domäne, die wiederum aus zwei C2-Domänen C2A und C2B besteht (Perin et al., 1991). Beide C2 Domänen können Calcium binden und damit Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration detektieren (Desai et al., 2000)(Davletov and Südhof, 1993). Durch die Bindung von Calcium an Synaptotagmin inserieren die beiden mit Calcium beladenen C2-Domänen in die Membranen (Davis et al., 1999)(Bai et al., 2000), außerdem bindet die cytoplasmatische Domäne von Synaptotagmin direkt an die t-SNAREs Syntaxin und SNAP25 (Bai et al., 2004) und induziert eine strukturelle Veränderung im SNARE Komplex, die die Fusion ermöglicht (s. Abb 2.4).

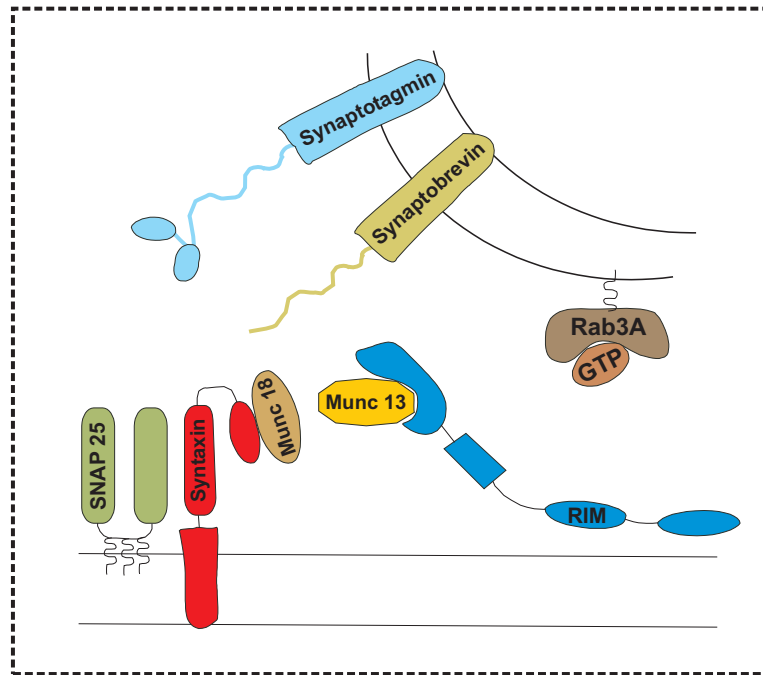
Neben dem Calcium-Sensor Synaptotagmin, der die Fusion in der Calcium ungebundenen Form verhindert, wird eine spontane Exocytose auch durch das Regulatorprotein Complexin unterbunden (Marz and Hanson, 2002) (s. Abb 2.4). Mit dem Einstrom von Calcium und dessen Bindung an Synaptotagmin wird Complexin allerdings von Synaptotagmin aus dem Komplex verdrängt und es kommt zu einer schnellen regulierten Fusion der beiden Membranen (Melia, 2007).

Zur Zeit wird diskutiert, ob die Vesikel während der eigentlichen Fusion komplett mit der Plasmamembran verschmelzen oder ob die Fusionspore nur für kurze Zeit ausgebildet wird. Gegenwärtig werden dazu drei Modellvorstellungen der Exocytose und des darauf folgenden Recycling diskutiert: Das erste Modell, das als *kiss and run* bezeichnet wird (Ceccarelli et al., 1973), besagt, dass die Vesikel vorübergehend mit der Membran fusionieren, und eine Fusionspore ausgebildet wird es aber dabei nicht zur vollständigen Durchmischung der beiden Membranen

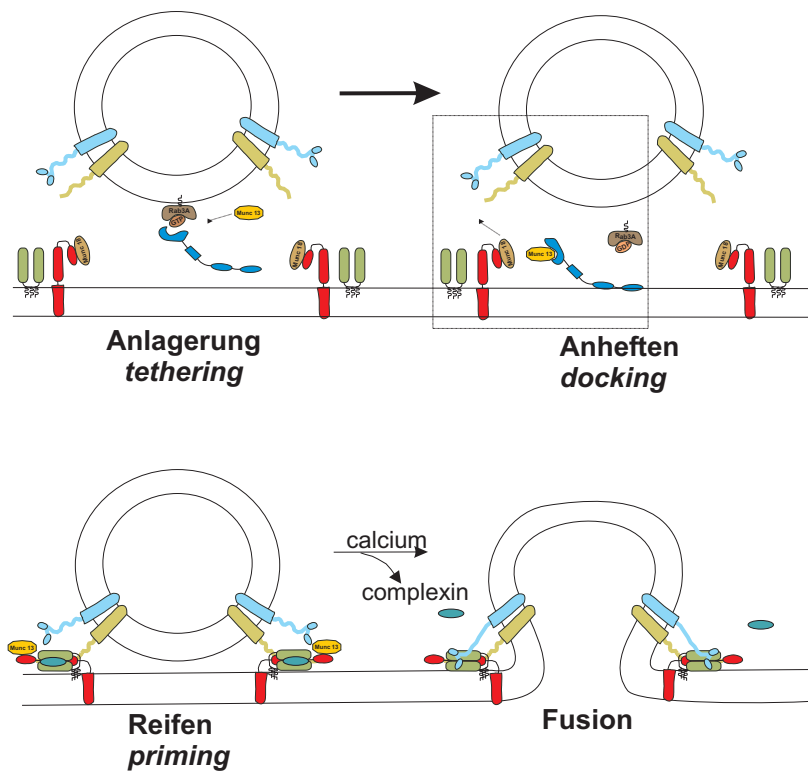
kommt. Zum anschließenden Recycling werden die an die Plasmamembran angehefteten Vesikel Clathrin-unabhängig abgeschnürt, wieder mit Neurotransmittern aufgefüllt und in einen neuen Sekretionszyklus eingeschleust. Ein zweites *kiss and stay* Modell (Barker et al., 1972) beschreibt einen Fusionsmechanismus bei dem zwischen Plasmamembran und Vesikel auch nur eine kurzfristige Fusionspore entsteht, die Vesikel aber anschließend in der aktiven Zone bleiben und dort direkt mit Neurotransmittern aufgefüllt und somit recycled werden. Und schließlich gibt es das klassische Modell, nach dem das Recycling in Form einer typischen Clathrin-vermittelten Endocytose unabhängig vom Fusionsort erfolgt (*endosomal recycling*) (Heuser and Reese, 1973).

Studien der vergangenen Jahre haben überzeugend gezeigt, dass in Spermien ebenfalls die Komponenten des SNARE-Komplexes wie SNAP23, SNAP25, VAMP, VAMP2, Syntaxin 1A, Syntaxin 1B, Syntaxin 4 und Syntaxin 6 exprimiert werden (Tomes et al., 2002) (Ramalho-Santos et al., 2000) (Katafuchi et al., 2000). Darüber hinaus führte die Vorbehandlung der Spermien mit den Botulinum Neurotoxinen (BoNT/A, -B, -C1, -D, -E, -F, und -G) zu einer Blockierung der Akrosomenreaktion (Tomes et al., 2002). Da diese Neurotoxine ausschließlich freie, nicht komplexierte SNARE-Proteine spalten (Hayashi et al., 1994) (Schiavo et al., 2000) und deshalb als Inhibitoren der Vesikelfusion wirken (Schiavo et al., 1992), scheint die akrosomale Exocytose in Spermien auch über die SNARE-Proteine vermittelt zu werden (Tomes et al., 2002). Weitere Hinweise darauf geben Studien an permeabilisierten Spermien, die gezeigt haben, dass die Proteine Rab3A (Yunes et al., 2000), die ATPase NSF (Michaut et al., 2000), und der Calcium-Sensor Synaptotagmin VI (Michaut et al., 2001), wie bei der regulierten Exocytose an der Synapse, auch an Teilprozessen der Akrosomenreaktion beteiligt sind. Wegen diese Analogie zur Vesikelfusion sind Spermien ein geeignetes Modellsystem um aktuell die Teilprozesse dieses sequentiellen Fusionsprozesses zu untersuchen (Mayorga et al., 2007).

A



B



2.3 Aufbau und Organisation von zellulären Signalkaskaden

2.3.1 *Lipid rafts* als Organisatoren von Signaltransduktionskaskaden

Das ursprünglich von Singer und Nicolson aufgestellte Flüssig-Mosaik-Modell der Zellmembran (*fluid mosaic model*) besagt, dass sowohl die Lipide als auch die peripheren und integralen Membranproteine lateral ungehindert innerhalb der Lipiddoppelschicht diffundieren können (Singer and Nicolson, 1972). Spätere Arbeiten zeigten allerdings, dass speziell die Phospholipide in manchen Bereichen der Membran nicht immer frei beweglich sind (Kusumi and Sako, 1996), was dazu führt, dass

Abbildung 2.4: Molekulare Prozesse der Vesikelfusion. [A] Während der Vesikelfusion verschmilzt die vesikuläre Membran mit der Plasmamembran wobei der Inhalt des Vesikels entleert wird. Für die Fusion werden neben den SNARE (*soluble-N-ethylmaleimide sensitive factor attachet protein receptor*)-Proteinen auch verschiedene Regulatorproteine wie die kleine GTPase Rab3A, Munc13 und Munc18 sowie RIM1 benötigt. Man unterscheidet zwischen t-SNAREs wie SNAP25 und Syntaxin, die in der Plasmamembran und v-SNAREs wie Synaptobrevin, die in der Vesikelmembran lokalisiert sind. Erst durch die Interaktion der SNARE-Proteine wird die Fusion gegenüberliegender Membranen möglich. [B] Der Prozess der Fusion kann in vier aufeinander folgende Prozesse unterteilt werden: Zunächst muss es zur Annäherung des Vesikels mit der Plasmamembran an einer bestimmten Fusionsstelle kommen (*tethering*); anschließend muss das Vesikel an die Membran angeheftet werden (*docking*) und einen Reifungsprozess durchlaufen (*priming*), bevor es durch eine Erhöhung des cytosolischen Calciums zur Fusion der beiden gegenüberliegenden Membranen kommt. Die Anlagerung der beiden Membranen wird über sogenannte *tethering*-Faktoren eingeleitet. Diese sind multimere Komplexe, die aus vielen Untereinheiten bestehen und dafür sorgen, dass die Vesikel an der richtigen Fusionsstelle verankert werden. Das Anheften findet anschließend über die kleine GTPase Rab3A und deren Interaktionspartner RIM1, einem Protein der aktiven Zone, statt. Munc18 ist ein weiteres Protein, das an dem Prozess des *dockings* beteiligt ist; es bindet an das t-SNARE Syntaxin in seiner geschlossenen Konformation und verhindert damit, dass der SNARE-Komplex aufgebaut werden kann. Die angehefteten Vesikel durchlaufen anschließend einen Reifungsprozess. Munc13 ist an diesem maßgeblich beteiligt. Dieses Regulatorprotein wird über die Bindung an RIM1 an die aktive Zone angelagert, wo es anschließend Munc18 aus dem Komplex mit Syntaxin verdrängt. Dadurch kann sich der trimere SNARE-Komplex aus Syntaxin, SNAP25, Synaptobrevin und Complexin bilden. Complexin verhindert, dass es auch ohne Calcium zur Konformationsänderung des SNARE-Komplexes und somit zur spontanen Fusion kommt. Erst durch die lokale Erhöhung der Calciumkonzentration, die über den Calcium-Sensor Synaptotagmin detektiert wird, wird Complexin aus dem Komplex verdrängt, und es kommt zur Fusion der gegenüberliegenden Membranen.

Lipid-Mikrodomänen entstehen (Simons and Ikonen, 1997). Speziell die Sphingolipide und das Cholesterol der Membran sind innerhalb dieser Bereiche über eine direkte Interaktion miteinander zu Plattformen oder auch *rafts* zusammengefasst (Simons and Ikonen, 1997). Dabei werden zwei strukturell unterschiedliche *raft*-Typen unterschieden: Auf der einen Seite die flaschenförmigen Caveolae, die sich durch eine Anreicherung des integralen Membranproteins Caveolin auszeichnen (Tsai et al., 2007) (Travis et al., 2001) (s. Abb. 2.5), und die planaren *lipid rafts*, die kein Caveolin besitzen (Simons and Toomre, 2000) (s. Abb. 2.5). Aufgrund ihres hohen Anteils an Cholesterol sind *lipid rafts* im Gegensatz zu anderen Bereichen der Membran bei 4 °C in nicht-ionischen Detergenzien wie z. B. Triton X-100 unlöslich (Ostrom and Liu, 2007) und können so von den übrigen Bereichen der Membran abgetrennt werden; sie werden daher häufig auch als *detergent-insoluble glycolipid membrane complexes* (DIGs) oder *detergent resistant membranes* (DRM) bezeichnet.

In den vergangenen Jahren hat sich gezeigt, dass *lipid rafts* spezialisierte Plattformen für die subzelluläre Organisation von Signalkomplexen darstellen, in denen in vielen Fällen Rezeptoren, Ionenkanäle, heterotrimere G-Proteine sowie deren cytoplasmatische Effektoren konzentriert und so in unmittelbare räumliche Nähe zueinander gebracht werden (Allen et al., 2007) (Golub et al., 2004) (s. Abb. 2.5). Dabei werden die Signalproteine entweder über eine direkte Bindung an das integrale Membranprotein Caveolin (Patel et al., 2008b) oder über eine Interaktion mit Proteinen, die bereits mit *rafts* assoziiert sind (Brown, 2006), in den Membranmikrodomänen verankert (Patel et al., 2008a).

Kürzlich wurden derartige Plattformen auch in Spermien verschiedener Säuger speizes nachgewiesen (Cross, 2004) (Travis et al., 2001), wobei u. a. Komponenten der Fusionsmaschinerie, die auch in somatischen Zellen in Detergenz-unlöslichen Membranmikrodomänen zu finden sind (zur Übersicht (Lang, 2007)), wie das t-SNARE Syntaxin und das v-SNARE VAMP, in *lipid rafts* von Spermien nachgewiesen wurden (Tsai et al., 2007). Während der Kapazitation findet eine räumliche Umorganisation der *lipid rafts* statt (Thaler et al., 2006) (Boerke et al., 2008). Durch den Verlust von Cholesterol, der wesentlichen Lipidkomponente der *lipid rafts*, kommt es offenbar zu einer vermehrten Konzentrierung dieser Domänen im apikalen Bereich des Kopfes der Spermien (Thaler et al., 2006). Zudem werden

die SNARE-Proteine Syntaxin und VAMP so im Bereich ihres späteren Bestimmungsorts verankert (Tsai et al., 2007).

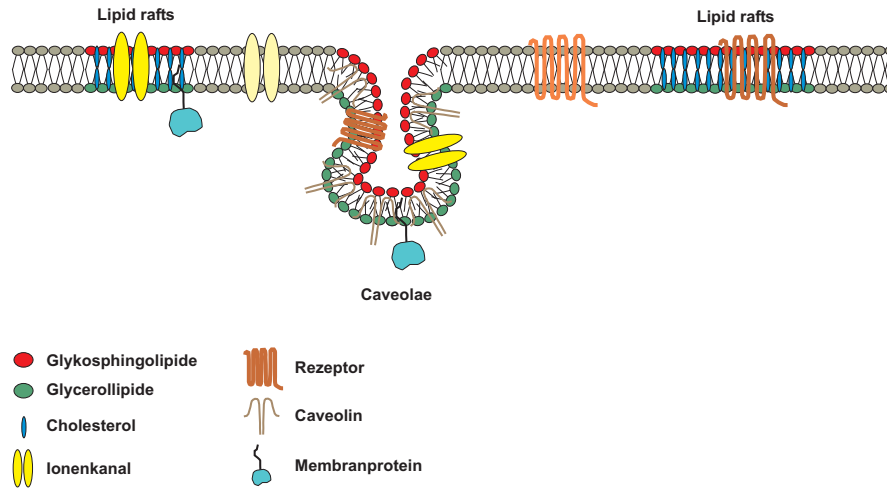


Abbildung 2.5: Organisation von *lipid rafts*.

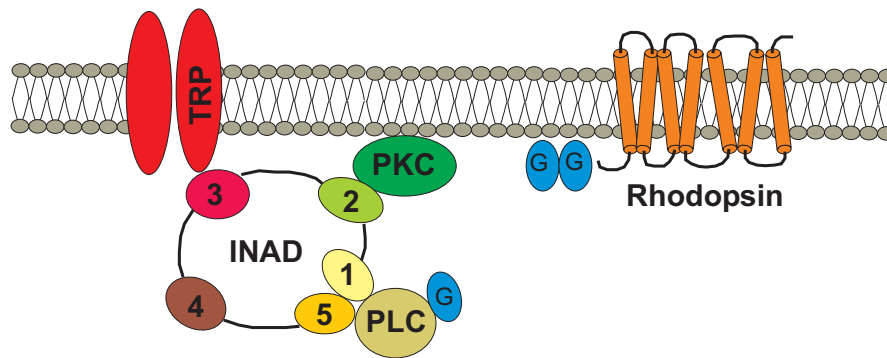
Lipid rafts sind Bereiche in der Plasmamembran, die sich durch ihren höheren Cholesterol- und Sphingolipidanteil auszeichnen. Man unterscheidet zwischen planaren *lipid rafts* und den flaschenförmigen Einstülpungen, den *Caveolae*, in denen das integrale Membranprotein Caveolin angereichert ist. Signalmoleküle wie Ionenkanäle, Rezeptoren und deren Effektoren sind häufig innerhalb von *lipid rafts* in der Plasmamembran konzentriert.

2.3.2 Signalkomplexe werden mit Hilfe von PDZ-Domänen Proteinen organisiert

Neben den *lipid rafts*, durch die Signalmoleküle in bestimmten Kompartimenten subzellulär organisiert werden, besitzen viele Zellen Gerüstproteine als zusätzliche Möglichkeit, Signalkomponenten in räumliche Nähe zu einander zu bringen (Tsunoda et al., 1997). Adapterproteine oder auch *Scaffolding*-Proteine zeichnen sich durch eine oder mehrere Protein-Protein Interaktionsdomänen aus, wobei die *PSD* (*post synaptic density*) 95, *Dlg* (*disc-large*) und *ZO-1* (*zonula occludens protein 1*) PDZ-Domäne die häufigste Proteininteraktionseinheit im Metazoengenom ist (Jelen et al., 2003). PDZ-Domänen binden andere Proteine typischerweise über ein 4-5 Aminosäure langes, häufig C-terminal gelegenes Motiv (Kornau et al., 1995). Es werden aber auch interne Peptidmotive, die in Form

einer β -Haarnadelschlaufe das C-terminale Ende von Proteinen imitieren, von PDZ-Domänen gebunden (Sheng and Sala, 2001) (Nourry et al., 2003). Zusätzlich können PDZ-Domänen miteinander interagieren, so dass über die Bildung von Homo- und Heterodimeren (Dong et al., 1999) Protein-Netzwerke interagierender Gerüstproteine innerhalb der Zelle entstehen können.

Eines der bekanntesten Beispiele eines PDZ-Domänen Proteins ist das INAD (*inactivation no afterpotential D*) in den Photorezeptorzellen von *Drosophila melanogaster*, das 5 PDZ-Domänen besitzt (Shieh and Zhu, 1996)(Tsunoda et al., 1997). Es komplexiert in den Rhabdomeren der Komplexaugen von Insekten Signalmoleküle der Phototransduktion, wie die Phospholipase C (PLC), die Proteinkinase C (PKC), Calmodulin (CaM) und einen von drei TRP-Kanälen (zur Übersicht (Huber, 2001)) und bildet so das molekulare Rückgrat eines supramolekularen Multiproteinkomplexes (Transduciom) (Tsunoda et al., 2001). Die Ausbildung des Signalkomplexes ist für die enormen Geschwindigkeit der Signalübertragung in Photorezeptorzellen notwendig, aber auch für die Verankerung der einzelnen Signalkomponenten entlang der Rhabdomerenmembran. Denn der komplette Verlust des Adapterproteins führt dazu, dass die Signalmoleküle nicht mehr in der Membran der Rhabdomeren lokalisiert sind und daher degradiert werden (Li and Montell, 2000) (Tsunoda et al., 2001). Ein weiteres Beispiel eines gut charakterisierten zellulären Systems multimerer Signalkomplexeinheiten ist die neuronale Synapse. Innerhalb der postsynaptischen Verdichtung (*post synaptic density*) (PSD) entlang der synaptischen Membran wird ein Teil der postsynaptischen Signalmaschinerie durch eine Reihe von PDZ-Domänen Proteinen wie dem *post synaptic density* 95 (PSD 95) subzellulär konzentriert (Hall and Sanes, 1993) (Kim and Sheng, 2004). Einige der bekanntesten Interaktionspartner des PSD 95 sind ionotrope Glutamaterezeptoren wie der NMDA-Rezeptor, wobei die Interaktion mit PSD 95 eine direkte Auswirkung auf dessen Stabilität bzw. Desensitisierung hat (Sornarajah et al., 2008). Weitere Interaktionspartner sind Ionenkanäle wie der *Shaker-type* K^+ -Kanal (Kim et al., 1995), Adhäsionsproteine wie z. B. Neuroligin (Irie et al., 1997) sowie Signalmoleküle wie die neuronale NO-Synthase (Kim et al., 1998). Über die Bildung des NMDA-PSD 95-nNOS Komplexes kann so die Aktivierung des NMDA-Rezeptors direkt mit der Produktion des Transmitters NO gekoppelt werden (Harris and Lim, 2001).



modifiziert nach P. Raghu

Abbildung 2.6: Aufbau des INAD-Signalkomplexes in Photorezeptorzellen von *Drosophila melanogaster*.

Die Moleküle der visuellen Signalkaskade im Insektenaugen werden über eine Interaktion an einer der 5 PDZ-Domänen des INAD in räumliche Nähe zueinander gebracht, wodurch die Spezifität und die enorme Signalgeschwindigkeit der Kaskade gewährleistet wird. Nach Aktivierung des 7 Transmembranrezeptors Rhodopsin, der nach der Absorption eines Lichtquants eine PLC aktiviert, kommt es zur Bildung von IP_3 und DAG und anschließend zur Öffnung von Kationenkanälen der TRP-Kanalfamilie, wodurch es zu einem Calciueinstrom in das Cytoplasma der Photorezeptorzelle kommt. Die schnelle Terminierung der primären Reizantwort wird über die PKC vermittelt, wodurch sowohl die Signalspezifität als auch eine hohe Signalgeschwindigkeit gewährleistet wird.

Das PDZ-Domänen Protein Multi-PDZ-Domänen Protein 1 (MUPP1)

Ein besonders auffälliges PDZ-Domänen Protein ist das Multi-PDZ-Domänen Protein 1 (MUPP1), das 13 PDZ-Bindungsmotive aber keine weitere Interaktions- oder katalytischen Domänen besitzt und eine starke Sequenzhomologie zum humanen Homolog des *Drosophila melanogaster* INAD, dem INAD-like (INADL) Protein aufweist (Ullmer et al., 1998) (s. Abb. 2.7).

Bis heute sind für das im Gehirn von Säugern besonders stark exprimierte Adapterprotein MUPP1 (Sitek et al., 2003) viele unterschiedliche Interaktionspartner identifiziert worden: An der neuronalen Synapse interagiert MUPP1 z. B. mit dem Serotoninrezeptor 5-HT_{2c}, wobei die Interaktion vom Phosphorylierungszustand des Rezeptors abhängig ist und damit eine Aktivitäts-abhängige Dynamik zeigt (Parker et al., 2003). Darüber hinaus ist MUPP1 auch an der Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen, den sogenannten *Tight junctions* beteiligt, indem es mit dem integralen Membranprotein Claudin 1 interagiert (Hamazaki et al., 2002).

Außerdem ist es ein cytoplasmatischer Ligand für das Proteoglycan NG2 (Barritt et al., 2000) und interagiert mit viralen Onkoproteinen (Lee et al., 2000), einem neuronalen Rho-GEF (Penzes et al., 2001) und dem *tandem pleckstrin homology domain protein 1* (TAPP1) (Kimber et al., 2002).

Nach neuesten Untersuchungen kann MUPP1 neben der topologischen Organisation von Signalkomplexen, auch einen regulatorischen Einfluss auf die Effizienz von Signalkaskaden ausüben; So bindet und stabilisiert MUPP1 z. B. den G-Protein gekoppelten Agonist-gebundenen Melatonin-Rezeptor und übt damit einen direkten Einfluss auf dessen G_i -vermittelte nachgeschaltete Signalkaskade aus (Guillaume et al., 2008). Außerdem wird der Transport von AMPA-Rezeptoren an die postsynaptische Membran auch durch die dynamische Interaktion von MUPP1 mit der CaMKII und einem *synaptischen GTPase activating protein* (SynGAP) beeinflusst (Krapivinsky et al., 2004).

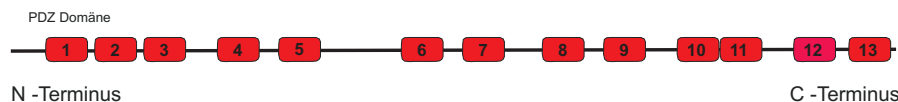


Abbildung 2.7: Struktureller Aufbau des *Multi PDZ domain protein 1* (MUPP1). Das Multi PDZ Domänen Protein MUPP1 besitzt 13 Protein-Protein-Interaktionsdomänen der PDZ-Familie und zeigt eine große Sequenzhomologie zu dem humanen Homolog des INAD der Insekten dem INAD-like (INADL). Neben den Interaktionsdomänen besitzt MUPP1 keine weiteren katalytischen Domänen.

2.4 Ziel der Arbeit

Jüngste Untersuchungen an Spermien verschiedener Säugerspezies haben gezeigt, dass MUPP1 in männlichen Keimzellen ausschließlich in der akrosomalen Region zu finden ist (Heydecke et al., 2006). Da die Akrosomenreaktion ein mehrphasiger Prozess ist, dessen beteiligte Funktionseinheiten sowohl zeitlich als auch räumlich organisiert sein müssen, könnte es sein, dass MUPP1 mit Hilfe seiner 13 PDZ-Domänen die einzelnen Komponenten der beteiligten Signalwege der akrosomalen Exocytose topologisch organisiert.

Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte die funktionelle Rolle von MUPP1 in Spermien mit Hilfe eines neu zu etablierenden Exocytose-Ansatzes analysiert werden. Darüber hinaus sollte die subzelluläre Lokalisation des Adapterproteins

durch elektronenmikroskopischen Untersuchungen und biochemischen Fraktionierungsexperimenten bestimmt werden. In einem dritten Ansatz sollten Hinweise auf die mögliche Zusammensetzung des über MUPP1 gebildeten Signalkomplexes in Spermien gesammelt werden. Dazu sollten mögliche neue Interaktionspartner mit Hilfe eines Hefe-Zwei-Hybrid-Screens identifiziert werden sowie bereits bekannte Interaktionspartner auf eine Expression und Co-Lokalisation mit MUPP1 in Spermien untersucht werden.

3 Materialien

3.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Adeninhemisulfat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Agar-Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Agarose peqGOLD	peqGOLD, Erlangen
Aminocaprinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin-Na-Salz	Applichem, Darmstadt
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
ATP (Adenosin-5'-triphosphat)	Serva, Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin)	Carl Roth, Karlsruhe
CaCl ₂	Calbiochem, Bad Soden
Calciumionophor A23187	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
cAMP-Analog (8pCPT-2'-O-ME-cAMP)	Biolog, Bremen
Chloroform	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Coomassie Blau G250	Serva, Heidelberg
DEPC	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Alrdich, Deisenhofen
d'NTPs	Fermentas, St. Leon Rot

Dropout-Mischung	Becton Dickinson, Heidelberg
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Filmentwickler (Dokumol)	Tetenal, Norderstedt
Fluorescent Mounting Medium	Dako Cytomation, Hamburg
Folsäure	Serva, Heidelberg
Formaldehyd-Lösung	Riedel-de-Haen, Seelze
Fötale Kälberserum	Pasching, (Österreich)
Glukose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Gluthation	Merck, Haar
Hefeextrakt	DIFCO, Heidelberg
Hepes	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Heringsspermien DNA	Sigma Aldrich, Deisenhofen
IPTG (Isopropyl- β -thiogalactopyranosid)	Fermentas, St. Leon-Rot
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kalium-L-Glutamat-Monohydrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
KHCO ₂	Merck, Haar
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Haar
Lactat	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Luminol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe

Natriumchlorid	Riedel-de-Haen, Seelze
Natrimdihydrogenphosphat	Merck, Haar
NaOH	Merck, Haar
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natrim-L-Ascorbat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natrim-Pyruvat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Para-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Paraformaldehydlösung, 16%	EM science, Ft. Washington
PCR Puffer (10fach)	Fermantas, St. Leon-Rot
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Polyethylenglykol (PEG)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protease Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem, Bad Soden
Protease Inhibitor Complete	Roche, Basel
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Streptolysin O (SLO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth, Karlsruhe
Tri-Fast peq GOLD	Peq Lab, Erlangen
Tris	Roth, Karlsruhe
TrisBase	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Western Blotting Detection	Amersham Bioscience, Freiburg
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-	Fermentas, St. Leon-Rot

β-D-galactopyranosid)

Yeast Nitrogen Base

Sigma-Aldrich

Ziegenserum

Sigma Aldrich, Deisenhofen

3.2 Puffer, Medien, Agarplatten und Antibiotika

Standardpuffer, Medien

PBS Puffer

150 mM NaCl

1,4 mM K₂HPO₄

TBST Puffer

270 mM NaCl

10 mM KCl

2 mM MgSO₄

4 mM CaCl₂

LB Medium

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

pH 7,0

ad 1l H₂O

LB Festmedium

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

pH 7,0

15 g Agar

ad 1l H₂O

Zur Selektion wurden dem LB-Medium/Festmedium 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

Puffer für molekularbiologische Methoden

S1 Puffer

50 mM Tris-HCL

S2 Puffer

200 mM NaOH

10 mM EDTA

1 % SDS

100 μ g/ml RNaseA

pH 8,8

S3 Puffer

2,8 M Kaliumacetat

pH 5,1

TAE-Puffer 50 x

2 M TrisBase

0,05 M EDTA

1 M Essigsäure

N2 Puffer

100 mM Tris

15 % Ethanol

900 mM Triton X 100

pH 6,3 einstellen mit H_3PO_4

N3 Puffer

100 mM Tris

15 % Ethanol

1,15 M KCl

pH 6,3 einstellen mit H_3PO_4

N5 Puffer

100 mM Tris

15 % Ethanol

1,15 M KCl

pH 8,5 einstellen mit H_3PO_4

Puffer für Hefe Methoden

YPD Medium

20 g/l Peptone

10 g/l Hefeextrakt

20 g/l Agar (nur für Platten)

SD Medium

6,7 g Yeast Nitrogen base without amino acids

20 g/l Agar (nur für Platten)

2 % Glukose

100 ml 10 fach Dropout Solution

***breaking* Puffer**

100 mM Tris/HCl, pH 8,0
1 mM DTT
20 % Glycerol

LiT Puffer

10 mM Tris/HCl, pH 7,4
100 mM Lithiumacetat

Puffer für proteinbiochemische Methoden

Anode I Blotting Lösung

300 mM Tris
20 % Methanol (v/v)

Kathode Blotting Lösung

40 mM e-Aminocaprinsäure
20 % Methanol (v/v)

Anode II Blotting Lösung

25 mM Tris
20 % Methanol (v/v)

Bradford Stammlösug

0,1 % Coomassieblau G250
(w/v)
in Ethanol

Sammelgelpuffer 4 x

500 mM Tris/HCl
0,4 % SDS
pH 6,8

Trenngelpuffer 4 x

1,5 M Tris/HCl
0,4 % SDS
pH 8,8

Probenpuffer für SDS-PAGE 4 x

250 mM Tris/HCl, pH 6,8
0,08 % Bromphenolblau
8 % SDS
20 % Glycerin

Homogenisierungspuffer

10 mM Tris/HCl
3 mM MgCl₂
2 mM EGTA
pH 7,4

10 % β -Mercaptoethanol

Bradfordreagenz

5 % Bradford Stammlösung (v/v)

8,5 % Phosphosäure (v/v)

Laufpuffer

20 mM Na_2HPO_4

150 mM NaCl

7,5 % Formaldehyd

Entfärberlösung

50 % Methanol

7 % Essigsäure

Coomassie Färbelösung

20 % Methanol

7 % Essigsäure

0,02 % Coomassie G250 Blau

Elutionspuffer

50 mM Tris/HCl

10 mM

pH 8,0

Puffer für reproduktionsbiologische Techniken

Coomassie Färbe Puffer

0,04 % Coomassieblau G250

50 % Methanol

10 % Essigsäure

40 % H_2O

HS Puffer

270 mM NaCl

10 mM KCl

2 mM MgSO_4

4 mM CaCl_2

Sukrosepuffer

250 mM Sukrose
0,5 mM EDTA
20 mM HEPES

HS *Working Solution*

135 mM NaCl
5 mM KCl
1 mM MgSO₄
2 mM CaCl₂
5 mM Glukose
30 mM HEPES pH 7,4
10 mM Lactat
1 mM Pyruvat
pH 7,4

Fixierungspuffer

20 mM Na₂HPO₄
150 mM NaCl
7,5 % Formaldehyd

Post-Fix Puffer

100 mM Ammonium-
acetat
pH 9,0

3.3 Gebrauchswaren

Artikel	Hersteller
Centricon (Microcon Ultracell YM-30)	Milipore, Schwalbach
Dounce-Homogenisator	Kontes, New Jersey
Eindeckmedium	Dako Cytomation, Hamburg
Einmalspritzen (Injekt-F 1 ml)	Braun, Melsungen
Fettstift (DakoCytomation Pen)	Dako Cytomation, Hamburg
Glasdeckgläser	Menzel, Braunschweig

Glasfärbekasten	Carl Roth, Mannheim
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Nitrocellulosemembran	Amersham Bioscience, Freiburg
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Hyper-ECL-Filme	Kodak, Stuttgart

3.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Bakterieninkubator	Heraeus, Hanau
Bakterienschüttler	Forma scientific, Dreieich
Binokular	Olympus, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M)	Zeiss, Jena
Homogenisator (RM 22)	Janker und Kunkel K.G., Staufen
Kamera, AxioCam MRC	Zeiss, Jena
Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 540 Meta)	Zeiss, Jena
Lichtmikroskop (Axiovert 25)	Zeiss, Jena
Mikroskop (LSM 540 Meta)	Zeiss, Jena
Pipetten	Gilson, Limburg-Offenheim
Pipettierhilfe	Hirschmann, Herrenberg
pH-Meter (Digital-pH-Meter 646)	knick, Berlin
Photometer (Biophotometer RS232C)	Eppendorf, Hamburg
PCR Maschine (GeneAmp PCR 2400)	Perkin Elmer, Wellesley (USA)
Schüttelheizblock (HTMR 131)	HLC, Bovenden
Schüttelwasserbad (WBU 45)	Memmert, Schwalbach

Spannungsquelle (Power Pack 35/60)	Phase, Lübeck
Spektrophotometer (Uvikon 930)	Kontron Instruments, Groß-Zimmern
Taumelschüttler (WT17)	Biometra, Göttingen
Ultraschallstab	Bandelin, Berlin
Ultra-turrax	Ika, Staufen
Ultrazentrifuge (L7-65)	Beckman, Krefeld
Überkopfroter	Philipps-Universität Marburg
UV-Schirm	BIO-RAD, München
Vortexer (MS2 Minishaker)	Ika, Staufen
Zellkultur-Inkubator	Forma Scientific, Dreieich
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

3.5 Antikörper

3.5.1 Primärantikörper

Antigen	Donor- spezies	Verd. ICC	Verd. WB	Herkunft
MUPP1 PDZ10	Kanninchen	1:100	1:5000	Prof. Tsukita
MUPP1 US5/6	Kanninchen	1:200	1:5000	Prof. Javier
Caveolin1	Kanninchen	-	1:1000	Santa Cruz
Rab3A	Kanninchen	1:100	1:500	Santa Cruz
CaM Kinase II	Maus	1:200	1:2000	Bioscience
CaM Kinase II (T ²⁸⁶ Phospho)	Maus	-	1:500	Santa Cruz

3.5.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Verd. ICC	Verd. WB	Hersteller
Ziege anti-Kaninchen IgG, (Peroxidase gekoppelt)	-	1:7500	Bio-Rad, München
Ziege anti-Kaninchen IgG, (FITC gekoppelt)	1:750	-	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ziege anti-Kaninchen IgG, (Alexa 546 gekoppelt)	1:500	-	Molecular Probes, USA
Ziege anti-Maus IgG, (Peroxidase gekoppelt)	-	1:300	Amersham, Freiburg
Ziege anti-Maus IgG, (FITC gekoppelt)	1:750	-	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ziege anti-Maus IgG, (Alexa 546 gekoppelt)	1:500	-	Molecular Probes, USA

3.6 Enzyme, Kits und Größenstandards

Artikel	Hersteller
DNA Marker (100bp und 1kb)	Fermentas, St. Leon-Roth
DNaseA	Fermentas, St. Leon-Roth
Gel extraction kit	Peqlab, Erlangen
Klonierungskit (pGEM-T Vektor)	Promega, Mannheim
Nucleobond AX-100	Macherey Nagel, Düren
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Roth
RevertAid H Minus M-MuLV	Fermentas, St. Leon-Roth

RNAse Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
Taq Polymerase	Fermentas, St. Leon-Roth
T4-Ligase	Fermentas, St. Leon-Roth
TOPO TA Expressions Kit	Invitrogen, Karlsruhe

3.7 Primer

Primer	Sequenz
AD insert rev	5'-ATTCGATGATGAAGATACCCCACCAAACC-3'
AD insert fw	5'-GAAGTGAAC TTGCGGGGTTTTTCAGTATC-3'
GAL4 seq	5'-ATCATCCATTGTAGTGGTATT-3'
Epac fw	5'-CGGAATTCCTGGGCCCCACTCTGGGTTCTT-3'
Epac rev	5'-GCGTCGACTCATGGTTCCAGCTCCCGGGAGAG-3'
Rim2 fw	5'-CGGAATTC CGTTTCAGCAGCACAAGCTAC-3'
Rim2 rev	5'-GCGTCGACCTATGAACGAGAGTAAGAAGGTCC-3'
MUPP6-9 fw	5'-CTGAATTCGCTTTTGGAGGGCCCGTTACT-3'
MUPP6-9 rev	5'-AGTCGACCTCAGCTCGAACAGTCAGTTT-3'
MUPP1GST fw	5'-CTCGAATTCCTCTTTTACCAGAAGAA-3'
MUPP1GST rev	5'-GAGGCGGCCGCTTATTCCTGGGACATGCT-3'
Rab3A fw	5'-GCGAATTCATGGCTTCCACCACAGACTCT-3'
Rab3A rev	5'-CGGTCGACTCAGCAGGCACAATCCTGATG-3'
PLC δ 4 fw	5'-GCGAATTCATCCTTGTAGTCCAGGTGATC-3'
PLC δ 4 rev	5'-CGGTCGACTCAGGGCTCATCCATATCCAG-3'

3.8 Plasmide

Plasmid	Hersteller
pcDNA3.1 V5/HIS	Invitrogen, Karlsruhe
pGEX4T1	Amersham Bioscience Europe, Freiburg
pGEX2T1	Amersham Bioscience Europe, Freiburg
pGBKT7	BD Bioscience, Heidelberg
pGAD424	Kay Schink, Universität Marburg, Genetik
pATC??	BD Bioscience, Heidelberg
pGADT7	BD Bioscience, Heidelberg
pGEMT	Promega, Mannheim

3.9 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
<i>E.coli</i> XL1-blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F ⁻ pro- Ab lacI ^q Z.M15 Tn10 (Tet ^r)]
<i>E.coli</i> DH5α	F ⁻ endA1hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)supE44,thi1 gyrA96(Nal ^r)relA1,recA1,Δ(argFlacIZYA)U169(ϕ80dlacZΔM15)
<i>E.coli</i> Rosetta	F ⁻ ompThsdSB(RB ⁻ mB ⁻)galdcmlλ(DE3[lacIIacUV5- T7gene1ind1sam7nin5]) pLysSRARE(Cam ^R)

3.10 Versuchstiere

Spezies, Stamm	Herkunft
Maus, Balbc, C57/B6	PD Dr. Alexander Dietrich; Charls River Wiga, Sulz- bach
Ratte, Wistar	Universitätsklinikum Marburg

4 Methoden

4.1 Tierhaltung

Die verwendeten Mäuse und Ratten wurden entweder im eigenen Tierstall des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie gezüchtet, oder von der zentralen Tierzucht des Fachbereiches Medizin der Universität Marburg bezogen. Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen bei einer Temperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 51 % in einer Klimakammer mit einem konstanten Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten. Als Futter wurde herkömmliches Nagerfutter (Rodent diet, Harlan, Teklad) verwendet; zum Trinken wurde Wasser gegeben.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Isolierung von RNA aus Geweben

Zur Isolierung von RNA wurde das entsprechende Gewebe (Cortex, Hoden, Nebenhoden) mit Hilfe eines Pistills in einem Mörser (steril) unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermahlen. Anschließend wurde das Pulver mit Hilfe eines sterilen Spatels in ein autoklaviertes RNase-freies Reaktionsgefäß mit Trifast-Reagenz (PE-QLAB, Erlangen) (1 ml/100 mg Gewebe) überführt. Die weitere Vorgehensweise basierte auf dem Guanidinisothiocyanat/Phenolextraktionsprotokoll von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987). Im Einzelnen wurde der Ansatz dazu für 5 min bei Raumtemperatur (RT) in dem Trifast Reagenz inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform pro anfänglich eingesetztem 1 ml TriFast zum Ansatz gegeben, für 5 min auf Eis inkubiert, eine Phasentrennung durch eine Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C herbeigeführt, und die obere wässrige Phase in ein neues RNase-freies 2 ml-Reaktionsgefäß über-

führt. Die RNA wurde anschließend durch die Zugabe von 500 μ l Isopropanol pro ursprünglich eingesetztem 1 ml TriFast für 5 - 10 min bei RT gefällt. Durch eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 13.000 rpm wurde die RNA anschließend sedimentiert, und der Überstand verworfen. Der entstandene Niederschlag wurde mit 75 % igem Ethanol gewaschen, für 2 - 5 min an der Luft getrocknet, in 50 μ l H₂O (DEPC behandelt) aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

4.2.2 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Die Konzentration von RNA bzw. DNA wurde direkt mit Hilfe eines Spektralphotometers (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) ermittelt. Nach einem Nullabgleich des Photometers gegen H₂O konnte das Absorptionsmaximum der DNA bzw. RNA in Lösung bei 260 nm bestimmt werden.

Zur Messung von Verunreinigungen mit Proteinen wurde die Absorption zusätzlich bei 280 nm bestimmt. Das Verhältnis aus den ermittelten Absorptionen bei 260 und 280 nm gibt den Reinheitsgrad der isolierten RNA bzw. DNA an und sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

4.2.3 Reverse Transkription mit anschließender Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RevertAidTM H Minus M-Mul V Transkriptase, Fermentas St. Leon-Roth) und zufälligen hexameren Primern wurde die isolierte RNA (siehe S. 37) in einem ersten Schritt in cDNA umgeschrieben (RevertAidTM H Minus First Strand cDNA synthesis Kit Fermentas, St. Leon-Roth)(Foley et al., 1993). In einem zweiten Schritt wurde mit Hilfe von spezifischen PCR-Primern gegen das gewünschte Zielgen und einer thermostabilen Polymerase (Taq-Polymerase, Fermentas St. Leon-Roth) eine doppelsträngige Kopie des zu analysierenden Gens synthetisiert. Im Einzelnen wurden dafür nach Angaben des Herstellers zwei Ansätze hergestellt: Der erste Ansatz bestand aus 1 μ l hexamere Primer (5 μ g/ μ l) und 10 μ l der als Matrix eingesetzten totalen RNA. Der zweite Ansatz setzte sich aus 4 μ l 5 x Reaktionspuffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1 μ l Ribonukleaseinhibitor, 1 μ l

dNTP Mix (10 mM) und 13 μ l mit DEPC behandeltes H₂O zusammen. Zu Beginn der Erststrangsynthese wurde die RNA zusammen mit den Primern für 5 min bei 70 °C inkubiert; anschließend mit dem zweiten Ansatz vereinigt und für weitere 10 min bei 25 °C inkubiert. Die Synthese der komplementären cDNA wurde durch die Zugabe von 1 μ l Reverse Transkriptase (200 U/ μ l, Fermentas St.Leon-Roth) gestartet, für 60 min bei 42 °C inkubiert und durch einen Hitzeschritt zur Inaktivierung des Enzyms (10 min 70 °C) gestoppt. Bis zur weiteren Verwendung der cDNA wurde der Ansatz bei 4 °C gekühlt bzw. bei -20 °C für längere Zeit gelagert.

4.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion (Mullis et al., 1986) dient der Amplifikation von spezifischen doppelsträngigen DNA-Fragmenten. Durch eine thermostabile Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* ist es mit Hilfe von spezifischen Primern, einem Gemisch an Nukleotiden (dNTPs) als Substrat und einer entsprechenden cDNA Matrize (*template*) möglich, ein spezifisches DNA-Fragment zu vervielfältigen (Amplifikation). Die PCR-Reaktion läuft in vier aufeinander folgenden Schritten ab: Zunächst wird das doppelsträngige DNA-Molekül bei einer Temperatur von 94°C in seine beiden Einzelstränge überführt (schmelzen). Während der darauffolgenden Inkubation bei 50 - 60 °C lagern sich die PCR-Primer an komplementäre Bereiche des DNA-Moleküls an (*annealing*). Die thermostabile Polymerase kann anschließend bei 72 °C, ausgehend von den angelagerten Primern, zum vorhandenen Einzelstrang einen komplementären DNA-Strang synthetisieren (*Elongation*). Durch eine erneute Denaturierung bei 94 °C beginnt der Zyklus erneut und führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung der gewünschten Ziel-DNA.

Amplifikation von spezifischen DNA Fragmenten aus cDNA

Aus Hoden cDNA der Maus wurden mit Hilfe einer PCR-Reaktion spezifische DNA-Fragmente amplifiziert. Dazu wurden die unter 3.12 (s. S. 34) aufgeführten Primer verwendet. Für die PCR-Reaktion wurden Primer, DNA, PCR-Puffer und Taq-Polymerase in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: 2,5 μ l 10 x PCR-Puffer (750 mM Tris-HCl [pH 8.8], 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1 % [v/v] Tween 20, [Fermentas, St. Leon Roth]), 2 μ l 25 mM MgCl₂ (Fermentas, St-Leon-Roth), 0,5 μ l

dNTPs (Roche, Mannheim), 0,5 μ l Primer A (100 pmol), 0,5 μ l Primer B (100 pmol), 0,5 μ l Taq-Polymerase (5 U/ μ l, Fermentas, St-Leon-Roth), 1 μ l cDNA (Plasmid - DNA wurde vor der Amplifikation 1:10 mit H₂O verdünnt); der Ansatz wurde bis zu einem Volumen von 25 μ l mit H₂O aufgefüllt. Für die PCR-Reaktion wurde, wenn nicht anders angemerkt, folgendes Temperaturprofil gefahren: Erste Denaturierung bei 94°C für 5 min Anschließend 40 Zyklen a: 50 s, 94 °C Denaturierung, 50 s zwischen 55 - 65 °C (je nach Länge und Sequenz der Primer) *annealing* der Primer, 50 s, 72 °C Synthese des komplementären DNA-Strangs.

Nach den Zyklen folgte eine Auffüllreaktion bei 70 °C für 10 min Zur Analyse der PCR-Reaktion wurden die Ansätze anhand einer Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und analysiert (siehe 4.2.5, S.40).

4.2.5 Agarose-Gel-Elektrophorese

Nukleinsäuremoleküle wandern aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im elektrischen Feld zur Anode. Mit Hilfe der Gelelektrophorese können deshalb DNA-Moleküle in einer Agarose-Gelmatrix, nach Anlegung einer elektrischen Spannung im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt werden (McDonell et al., 1977). Dabei bietet die Matrix den kleineren Molekülen einen geringeren Widerstand, wodurch sie entsprechend schneller zur Anode wandern. Zur Größenbestimmung werden DNA-Fragmente definierter Größe parallel im Gel aufgetrennt. Es wurden Gele mit Agarosekonzentrationen zwischen 1 und 1,5 % verwendet.

Eine entsprechende Menge Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer (2 M TrisBase, 0,05M EDTA, 60 ml 1 M Essigsäure) durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und mit 1 - 1,5 μ l Ethidiumbromid (10 μ g/ μ l) versetzt. Ethidiumbromid, ein roter Phenanthridin-Farbstoff, interkaliert zwischen die Basen der zu analysierenden DNA (Einlagerung im Abstand von 10 Basenpaaren), wodurch sich das Anregungsspektrum des Farbstoffes verändert, und so die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht wird (Aaij and Borst, 1972).

Die verflüssigte Agarose wurde in einen vorbereiteten Gelschlitten gegossen und mit einem Kamm (Taschenformer) zum Auftragen der Proben versetzt. Nach dem Aushärten wurde das Gel mit den DNA-Proben beladen, die zuvor mit 6 x Probenpuffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.6], 0.03 % Bromphenolblau, 0.03 % Xylene cyanol

FF, 60 % Glycerol, 60 mM EDTA) versetzt wurden.

Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer Spannung von 80 - 100 V. Während der Elektrophorese war anhand des Farbstoffes Bromphenolblau des Ladepuffers die zurückgelegte Strecke zu beobachten. Zur Größenbestimmung wurde parallel ein DNA-Größenmarker (GeneRulerTM 1kb DNA Ladder, bzw. GeneRulerTM 100bp DNA Ladder [Fermentas, St- Leon Roth]) verwendet.

4.2.6 Isolierung von DNA aus einem Agarosegel

Aufreinigung mittels Zentrifugation

Zur Aufreinigung der amplifizierten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht mit Hilfe eines sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. In dieses wurde zuvor am Boden mit einem spitzen Skalpell ein Loch eingeritzt und dann in ein zweites Reaktionsgefäß gestellt. Der gestapelte Aufbau wurde anschließend bei 13.000 rpm für 1 - 5 min zentrifugiert, wodurch die DNA aus der Agarose in das untere Gefäß eluiert wurde, während die Agarosereste im oberen Gefäß zurückgehalten wurden.

Aufreinigung mit Hilfe von DNA-Säulen

Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Gefäß überführt. Anschließend wurde 1 ml Binde-Puffer XP2 (Peqlab, Erlangen) auf 100 mg eingesetzten Gels gegeben. Um die Agarose im Puffer zu lösen, erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 65°C; durch mehrfaches Mischen wurde die Agarose im Puffer vollständig aufgelöst. Das gelöste Gel wurde anschließend auf eine DNA-Binde-Säule (Peqlab, Erlangen) gegeben und für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurde die DNA an der Matrix gebunden. Ungebundenes Material auf der Säule wurde zunächst einmal mit 300 μ l des Binde-Puffers XP2 (Peqlab, Erlangen) und anschließend zweimal mit 750 μ l des Waschpuffers SPW (Peqlab, Erlangen) entfernt (1 min 10.000g). Zur Elution der gebundenen DNA wurde die Säule in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt, mit 30 μ l Elutions-Puffer beschichtet und erneut für eine Minute

bei 10.000 g zentrifugiert; die DNA wurde dabei in das untere Gefäß eluiert. Die Konzentration der DNA wurde anschließend photometrisch bestimmt (siehe 4.2.2, S. 37) und anschließend bei -20 °C gelagert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Videodokumentationssystems.

4.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Unter Ligation versteht man in der Molekularbiologie ein Verfahren, bei dem das 3'-Hydroxy- und das 5'-Phosphat-Ende einer Nukleinsäure mit Hilfe eines Enzyms, einer Ligase, unter ATP-Verbrauch verbunden werden. (Lehman, 1974). Zur Ligation bestimmter DNA-Fragmente (*insert*) wurde das Enzym T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet. Um eine möglichst hohe Ligationsrate zu erreichen, wurden die optimalen Konzentrationen bzw. Mengenverhältnisse entsprechend der folgenden Gleichung berechnet:

$$\frac{(\text{ng DNA-Fragment mit Vektoranteil} \times \text{Größe des DNA-Fragment in kb})}{\text{Größe des Vektor in kb}} \times (3/1)$$

Vor der Ligation wurden die Vektor-Fragmente für eine Stunde bei 37 °C mit 1 μ l einer alkalischen Phosphatase SAP (*shrimps Alkaline Phosphatase*, Fermentas St. Leon Roth) inkubiert. Die SAP katalysiert die Hydrolyse von endständigen Phosphatgruppen von DNA, RNA, Ribo- und Desoxyribonukleotidtriphosphaten und unterdrückt damit die Selbstligation des Vektorfragments.

Abhängig von den errechneten Volumina wurde folgender Ansatz zur Ligation pipetiert: x μ l linearisierter Vektor, x μ l DNA-Fragment, 1 μ l T4-DNA-Ligase (1U/ μ l, Fermentas, St. Leon-Roth), 2 μ l T4-DNA-Ligase Puffer (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, [pH 7,8], [Fermentas, St. Leon Rot]). Der Ansatz wurde anschließend bis zu einem Volumen von 20 μ l mit H₂O aufgefüllt. Für die Reaktion wurde der Ligationsansatz über Nacht bei 16 °C inkubiert, eine Inaktivierung der Ligase erfolgte anhand eines Hitzeschritts (10 min 65 °C).

4.2.8 Ligation eines PCR-Fragments in einen Klonierungsvektor

Zur Klonierung aufgereinigter PCR-Fragmente wurde das pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Der darin enthaltene TOPO-Vektor ist linear und besitzt an seinen Enden Überhänge von Thymidin-Basen, an welche über eine energiereiche Phospho-Tyrosyl-Bindung eine Topoisomerase I kovalent gebunden ist (Shuman, 1994). Da die Taq-Polymerase eine terminale Transferaseaktivität besitzt, hängt sie am 3'Ende des PCR-Produkts eine einzelne Adenosin-Base an. Aufgrund der dadurch entstehenden komplementären, überhängenden Enden an dem Vektor und dem PCR-Produkt, können beide in unmittelbare Nähe zueinander gebracht und die Topoisomerase verdrängt werden; die dadurch frei werdende Energie ermöglicht dann die Bildung einer neuen Phosphodiesterbindung zwischen dem Vektor und dem PCR-Produkt. Auf diese Weise wird das Phosphatrückgrad des Vektors geschlossen und es entsteht ein zirkuläres Molekül aus Vektor und PCR-Fragment. Für die Ligation mit dem TOPO Klonierungsvektor wurden 0,5 μ l Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂ [Invitrogen, Karlsruhe]), 0,5 μ l pcDNA3.1/V5-His TOPO Vektor (Invitrogen, Karlsruhe), und 4 μ l DNA-Fragment in einem Ansatz zusammen gegeben und für 30 min bei RT inkubiert.

Neben dem pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Expressionskit wurden aufgereinigte PCR Fragmente zusätzlich mit Hilfe des pGEMT Vektors kloniert. Dazu wurden in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers (Promega, Mannheim) folgender Ansatz auf Eis hergestellt: 5 μ l *Rapid Ligation Buffer* (60 mM Tris/HCl [pH 7,8], 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10 % Polyethylenglykol), 1 μ l pGEMT Vektor (50 ng), 1 μ l T4 DNA Ligase (3 Weiss units/ μ l) und 1 - 3 μ l eluiertes PCR Produkt. Der Ansatz wurde bis zu einem Volumen von 10 μ l mit H₂O aufgefüllt. Zur Bildung von zirkulären Plasmiden wurde der Reaktionsansatz kurz gemischt und bei 4 °C ü. N. inkubiert. Der Ansatz wurde zur Inaktivierung der T4 Ligase für 10 min auf 65 °C erhitzt und anschließend bei 4 °C gelagert.

4.2.9 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* Zellen

Schon in den siebziger Jahren beobachtete man, dass *E.coli* Bakterien, die man in einer eisgekühlten Salzlösung inkubierte, DNA wesentlich effizienter aufnehmen als Zellen, die einer solche Behandlung nicht ausgesetzt waren (Mandel and Higa, 1970). Für die routinemäßige Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien benutzt man eine Lösung, die mit 50 mM Calciumchlorid versetzt ist. Die genaue Wirkungsweise des Calciumchlorids ist dabei nicht bekannt. Es wird allerdings diskutiert, dass durch das Calciumchlorid die DNA an der Außenseite der Zellen ausfällt; zusätzlich scheinen die hohen Salzkonzentrationen eine Veränderung der Zellwand zu bewirken, die dann zu einer verbesserten Anheftung der DNA an die Bakterienmembran führt.

Kompetente Bakterienzellen wurden in Anlehnung an die von Hanahan entwickelte Methode hergestellt (Hanahan, 1983). Im Einzelnen wurden 250 ml SOB-Medium (2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, pH 7,0) mit einer Einzelkolonie des Stamms DH5 α (XL1blue, rosetta) von einer LB-Festmedium-Platte inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 im Inkubationsschüttler wachsen gelassen. Die logarithmische Bakterienkultur wurde bei 4 °C für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert, die sedimentierten Zellen in 100 ml 50 mM CaCl₂ auf Eis resuspendiert und erneut bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Niederschlag wurde anschließend in 5 ml 50 mM CaCl₂ und 10 % Glycerin resuspendiert, und je 50 μ l der Bakteriensuspension in sterile Reaktionsgefäße aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.2.10 Transformation chemisch kompetenter *E.Coli* Zellen

Durch die Aufnahme von DNA-Molekülen werden Bakterien transformiert (Oishi and Cosloy, 1972). Spezielle Plasmide mit einem Replikationsstartpunkt für Bakterien können dadurch von diesen repliziert werden. Durch eine Antibiotika-Resistenz auf dem Expressionsplasmid (Amplicillin, Kanamycin) wird den Bakterien gegenüber Zellen ohne das entsprechende Plasmid ein Selektionsvorsprung in einem entsprechenden Antibiotika-suplementierten Selektionsmedium verschafft. Für die Transformation wurden chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsansatz bzw. anderer zu transformierender DNA-Proben gemischt

und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Hitzeschock für 45 s bei 42 °C wurden die Bakterien auf LB-Antibiotika Selektionsplatten ausgestrichen und zur Selektion auf rekombinante Kolonien über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.2.11 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* Zellen mittels alkalischer Lyse

Die alkalische Lyse dient der Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen (Birnboim and Doly, 1979). Dazu wurden 3 ml einer LB-Flüssigkultur mit 100 µg/ml Ampicillin mit einer Einzelkultur von einer LB-Festmediumsplatte inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 280 rpm inkubiert. Die Übernachtskultur wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, und die sedimentierten Bakterien in 200 µl des S1-Puffers (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA, pH 8,8) vollständig resuspendiert.

Zur alkalischen Lyse der Zellen wurden 400 µl des S2-Puffers (200 mM NaOH, 1 % SDS) zum Ansatz gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 300 µl des S3-Puffers (2,8 M Kaliumacetat) und einer Inkubation von 10 min auf Eis wurden Zelltrümer, denaturierte Proteine und chromosomale DNA präzipitiert. Durch eine Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 13.000 rpm wurde der Überstand geklärt in ein neues Reaktionsgefäß überführt, zur Präzipitation der Plasmid-DNA mit 600 µl 100% igem Ethanol versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 13.000 rpm bildete die präzipitierte DNA ein weißes Sediment am Boden des Gefäßes. Der Überstand wurde verworfen, die Plasmid-DNA mit 600 µl 70 %igen Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Der getrocknete Niederschlag wurde in 50 µl H₂O aufgenommen und sowohl die Konzentration, als auch die Qualität der isolierten DNA über die Extinktion bei 260 nm und 280 nm photometrisch bestimmt.

4.2.12 Präparation von Plasmid-DNA aus *E-coli* Zellen im präparativen Maßstab

Zur Isolierung größerer Plasmidmengen wurde das NucleoBond *Plasmid Purification Kit* (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Zunächst wurden 250 ml einer LB-Flüssigkultur mit 250 μ l Antibiotika als Selektionsmarker versetzt und mit einer einzelnen Kultur von einer LB-Festmediumsplatte inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 280 rpm inkubiert. Die Übernachtskultur wurde für 15 min bei 4 °C und 5000 g abzentrifugiert und die sedimentierten Zellen in 8 ml S1-Puffer (50 mM Tris/HCL, 10 mM EDTA, 100 μ g/ml RNaseA, pH 8,0) resuspendiert. Durch die Zugabe von 8 ml S2-Puffer (200 mM NaOH, 1% SDS) wurden die Bakterien lysiert und anschließend mit 8 ml S3-Puffer (2,8 M Kaliumacetat, pH 5,1) versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis bildete sich ein Präzipitat aus denaturierten Proteinen und chromosomaler DNA, welches durch eine Filtration durch einen Faltenfilter von der übrigen Lösung getrennt wurde. Für die weitere Aufreinigung der DNA wurde eine Silikat-Anionentauscher-Säule verwendet, die negativ geladene Moleküle wie z. B. DNA selektiv bindet. Die Säule wurde zunächst mit 2,5 ml N2 Puffer (100 mM Tris, 15 % Ethanol, 900 mM Triton X-100, pH 6,3) equilibriert und mit der geklärten Zellysat-Lösung beladen. Nach zweimaligem Waschen mit N3 Puffer (100 mM Tris, 15 % Ethanol, 1,15 M KCl, pH 6,3 einstellen mit H₃PO₄) wurde die DNA von der Matrix mit 5 ml Elutionspuffer (100 mM Tris, 15% Ethanol, 1,15 M KCl, pH 8,5 einstellen mit H₃PO₄) in ein neues Gefäß eluiert. Durch die Zugabe von 3,5 ml Isopropanol wurde die DNA gefällt, auf 2 ml Reaktionsgefäße verteilt und für 30 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend mit 70 % igem Ethanol gewaschen und erneut für 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur wurde die DNA in 100 μ l H₂O aufgenommen; die Konzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt (siehe 4.2.2, S. 37).

4.2.13 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Die Restriktionsendonukleasen sind Abbauenzyme, die den Bakterien zur Immunabwehr dienen. Sie sind in der Lage, anhand des Methylierungsmusters der DNA

zwischen ihrer eigenen und fremder DNA zu unterscheiden und können so fremde DNA z. B. von Phagen erkennen und gezielt abbauen. Man unterscheidet innerhalb der Restriktionsendonukleasen drei Klassen (Typ I, II und III), wobei speziell Enzyme des Typs II für die DNA-Klonierung eingesetzt werden, da sie eine typische palindromische Sequenz von vier, sechs oder acht Basenpaaren erkennen, binden und anschließend spalten (Hedgpeth et al., 1972). Dabei können durch die Spaltung glatte (*blunt ends*) oder überhängende DNA-Enden (*sticky ends*) entstehen. Es wurden verschiedenste Restriktionsverdauansätze mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen durchgeführt. Pufferbedingungen, Inkubationszeiten und Temperaturen wurden anhand der Herstellerempfehlung (Fermentas, St. Leon Roth) gewählt. Der Restriktionsverdau wurde über eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anhand der Größe der entstandenen DNA-Fragmente analysiert. Die verwendeten Enzyme stammten von Fermentas (St. Leon-Roth).

4.3 GST-Fusionsproteine

Das Glutathione S-Transferase (GST) Genfusionssystem ist nicht nur ein ideales System für die Expression, Reinigung und Detektion von in *E. coli* produzierten Fusionsproteinen, sondern darüber hinaus dazu geeignet, Protein-Protein Wechselwirkungen zu analysieren. Das System basiert auf der induzierbaren Expression von Genen oder Genfragmenten durch das Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbare lac-Promotorsystem von *E. coli*, wobei die zu analysierenden Proteine als Fusionsproteine mit der GST (26 kDa) von *Schistosoma japonicum* exprimiert werden (Smith and Johnson, 1988).

4.3.1 Expression von GST-Fusionsproteinen

Zur Expression der verschiedenen GST-Fusionsproteine wurden 3 ml LB Medium mit einer *E. coli* Einzelkolonie, das ein entsprechendes Expressionsplasmid (pGEX) besaß, von einer LB-Festmediumsplatte inokuliert und ü. N. bei 37 °C und 280 rpm inkubiert. Anschließend wurden 250 ml LB Medium mit 250 μ l der Übernachtskultur inokuliert und für ca. 3 - 4 h bei 37 °C und 280 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 - 1,0 wachsen gelassen. Die Expression des Fusionsproteins

wurde durch die Zugabe von 250 μ l 100 mM IPTG (Endkonzentration 0,1 mM) induziert, und die Bakterien für weitere 4 - 5 h bei 37 °C und 280 rpm wachsen gelassen. Durch eine Zentrifugation bei 7700 g für 10 min wurden die Bakterien anschließend aus der Suspension sedimentiert und bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C eingefroren.

4.3.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

In Bakterien exprimierte Fusionsproteine können aufgrund ihres Epitoptags aus einem Bakterienlysat effektiv aufgereinigt werden (Smith and Johnson, 1988). Die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen geschieht mit Hilfe von Glutathion Sepharose 4B (Amersham, Freiburg). Der Glutathion S-Transferase Rest des Fusionsproteins interagiert dabei mit dem Glutathion, welches wiederum an kleine Sepharosekügelchen gekoppelt ist; so kann das Fusionsprotein über einen Zentrifugationsschritt aus dem Bakterienlysat aufgereinigt werden. Um es anschließend wieder von der Matrix zu lösen, wird die Sepharose mit einem Puffer, der einen Überschuss an Glutathion enthält, gewaschen und der Reinheitsgrad des eluierten Proteins mit Hilfe eines SDS-PAGE und einer Coomassie Blau Färbung analysiert.

Für die Aufreinigung wurden die sedimentierten Bakterien aus einer 250 ml LB Kultur zunächst in 12,5 ml PBS aufgenommen und auf Eis inkubiert. Um zu verhindern, dass Proteasen während der Präparation Proteine enzymatisch verdauen, wurden der Bakteriensuspension 6,25 μ l einer 5 M Stammlösung des Protease Inhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Endkonzentration 2,5 mM) zugesetzt. Zur Lyse der Zellen wurden 625 μ l 20 % Triton X 100 (Endkonzentration 1 %) zu der Bakteriensuspension gegeben, die Zellen anschließend dreimal für 20 s mit dem Ultraschallstab auf Eis beschallt und anschließend für 1 h bei RT inkubiert. Um intakte Organellen und Zellkerne von den löslichen Proteinen im Überstand zu trennen, wurde die Bakterienlösung für 10 min bei 8500 rpm zentrifugiert, und der Überstand in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Isolation des zu analysierenden Proteins aus dem Gemisch wurde die Lösung mit einer 50 % igen Glutathion Sepharose 4B Suspension inkubiert. Dazu wurde das Säulenmaterial (250 μ l auf 250 ml Bakterienkultur) zunächst für 5 min bei 500 g zentrifugiert.

Zum Waschen wurde der Überstand vorsichtig entfernt, und die Sepharose mit 10ml PBS gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 min bei 500 g wurde die Sepharose in 1 ml PBS pro 1,33 ml eingesetzter Sepharose - Lösung resuspendiert. Von dieser Sepharose-Lösung wurden 250 μ l pro ursprünglichen 250 ml Bakteriensuspension auf die löslichen Überstände gegeben und für 1,5 h bei 4 °C in einem Überkopfroter inkubiert. Die an die Sepharose gebundenen Proteine wurden anschließend dreimal mit jeweils 10 ml PBS gewaschen. Zum Sedimentieren wurde jeweils für 5 min bei 500 g zentrifugiert.

Um das gewünschte Protein selektiv zu eluieren wurde die Sepharose in 250 μ l Elutionspuffer (50 mM Tris, 10 mM Glutathion, pH 8,0) aufgenommen, für 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 1 min bei 500 g zentrifugiert. Das eluierte Protein im Überstand wurde anschließend in ein frisches Reaktionsgefäß überführt werden. Dieser Schritt wurde, um eine höhere Effizienz zu erreichen, noch 2 mal wiederholt. Das aufgereinigte Protein wurde anschließend zum Austausch des Elutionspuffers in einem Centriconröhrchen mit der Ausschlußgröße 30 bzw. 10 kDa (Centricon Millipore, Schwalbach) für 10 - 20 min bei 12.000 g zentrifugiert. Die auf diese Weise ankonzentrierte Proteinlösung wurde mit PBS aufgefüllt und erneut für 10 - 20 min bei 12.000 g zentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentration des aufgereinigten Proteins wurde mit Hilfe der Bradford Methode bestimmt; Reinheit und Größe wurden mit Hilfe eines mit Coomassie Blau G250 gefärbten SDS-PAGE überprüft. Die so hergestellten GST-Fusionsproteine wurden im *in vitro*-Bindungs Assay eingesetzt (s. 4.3.3).

4.3.3 *In vitro*-Bindungs Assay (GST pull-down)

Mit Hilfe eines GST *pull-down* können Protein-Protein Interaktionen *in vitro* nachgewiesen werden (Kaelin et al., 1991). Dazu wird ein bekanntes Protein bzw. einzelne Proteindomänen, deren Interaktionspartner man untersuchen möchte, N - oder C - terminal mit einem GST-Epitoptag versehen und anschließend in *E.coli* exprimiert (s. 4.3.1) und aufgereinigt (s. 4.3.2). Für die spätere Interaktionsstudie wird eine definierte Proteinmenge des aufgereinigten Fusionsproteins erneut an Glutathion Sepharose 4B gekoppelt und mit Zelllysate des zu untersuchenden Gewebes inkubiert. Dabei kommt es zur Bindung des GST-Fusionsproteins mit

seinen potentiellen Interaktionspartnern aus dem Zelllysate, die dann mit Hilfe der Glutathion-Sepharose aus dem Lysat aufgereinigt und anschließend mit Hilfe der Westernblot-Technik analysiert werden können.

Für einen GST *pull-down* Ansatz wurden einzelne Regionen des MUPP1 der Ratte als Fusionsproteine hergestellt und aufgereinigt (siehe 4.3.2, S. 48) (PDZ-Domäne 1 - 3, 4 - 5, 6 - 9, 10 - 11, 12 - 13), als Negativkontrolle diente aufgereinigtes GST. Je 75 μg der aufgereinigten GST-MUPP1 Konstrukte wurden zusammen mit 60 μl einer 50 % igen Glutathion-Sepharose Lösung ü. N. bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose dreimal mit 250 μl PBS gewaschen, und zum blocken von unspezifischen Bindestellen für ca. 1 h mit 250 μl 10 % BSA in PBS bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Das eingesetzte Zelllysate wurde aus verschiedenen Geweben der Ratte hergestellt (Cortex, Hoden, Spermien). Dazu wurde das entsprechende Gewebe (Cortex oder Hoden) in 3 - 6 ml Homogenisationspuffer plus 1:100 des Proteaseinhibitor sets III (Calbiochem, Darmstadt) im Dounce-Homogenisator homogenisiert und anschließend dreimal für ca. 10 s mit dem Ultraschallstab beschallt. Zur Herstellung des Spermienhomogenisats wurden die Nebenhoden einer Ratte in 2 ml Homogenisationspuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 3 mM MgCl_2 , 2 mM EGTA [plus 1:100 des Proteaseinhibitor sets III]) überführt, mit einer feinen Schere eingeschnitten und für 30 min bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit schwammen die motilen Spermien aus den Nebenhodenkanälchen in den Homogenisationspuffer und konnten dann leicht in den Dounce-Homogenisator überführt und homogenisiert werden. Das Spermienhomogenisat wurde analog zu den Hoden - und Cortexproben zusätzlich mit dem Ultraschallstab beschallt. Alle Lysate wurden anschließend zur Abtrennung von Zellkernen und intakten Organellen für 10 min bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert; anschließend wurde der Überstand zur vollständigen Entfernung von unlöslichen Zellfragmenten erneut für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die Proteinkonzentration des hergestellten S10 Überstandes wurde anschließend mit Hilfe der Bradford Methode (siehe 4.5.3) bestimmt.

Auf die nach dem Blockieren noch dreimal mit PBS gewaschene Sepharose wurden anschließend 250 - 1000 μg des jeweils hergestellten S10 Überstands der verschiedenen Lysate gegeben und ü. N. bei 4 °C auf einem Überkopfrötor inkubiert. Die Sepharose wurde erneut dreimal mit 250 μl PBS gewaschen, in 30 μl einfach La-

depuffer (250 mM Tris/HCl, pH 6,8, 0,08 % Bromphenolblau, 8 % SDS, 20 % Glycerin, 10 % β -Mercaptoethanol) aufgenommen und für 5 min bei 94 °C aufgekocht. Durch das Aufkochen werden die GST-Fusionsproteine von der Sepharose gelöst und können nach einer erneute Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm in Form des löslichen Überstand leicht über ein SDS-PAGE aufgetrennt werden. Mit Hilfe der Westernblot-Technik wurde anschließend die Komplexbildung der einzelnen MUPP1-Domänen mit bekannten Proteinen wie der Calcium/ Calmodulin Kinase II (CaMKII) oder dem *Rab3A interacting molecule 2* (RIM2) untersucht. Um zu prüfen, ob die beobachtete Interaktion zwischen MUPP1 und CaMKII durch deren Aktivitätszustand beeinflusst wird, wurde der GST *pull-down* in Gegenwart des CaMKII Inhibitors KN93 durchgeführt. Dieser ist ein Blocker, der die Bindung von Calcium-Calmodulin kompetitiv inhibiert und damit die Autophosphorylierung und Aktivierung der CaMKII unterbindet (Marley and Thomson 1996). Dazu wurden die S10 Überstände aus Hoden und Rattenspermien vor der Inkubation mit den GST-MUPP1 Fusionsproteinkonstrukten für 30 min bei 4 °C mit KN93 inkubiert.

4.4 Hefe Methoden

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein einzelliger, eukaryotischer Organismus, der sich hauptsächlich durch Sprossung vermehrt. Sie kann einfach auf definierten Mangelmedien angezogen werden und ist den klassischen Methoden der Genetik zugänglich. Häufig wird die Hefe als Modellorganismus verwendet, um neue Interaktionspartner zu identifizieren.

4.4.1 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (*yeast two hybrid system*) ist eine Technik zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen (Fields and Song, 1989). Es wurde ursprünglich für die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* entwickelt, ist heute allerdings auf viele andere Zellsysteme ausgeweitet worden. Das allgemeine Prinzip basiert darauf, dass man funktionelle Domänen von Transkriptionsfaktoren als einzelne Proteine oder als Fusionsproteine exprimiert (z. B. den GAL4 Transkrip-

tionsfaktor), wobei die einzelnen Domänen des verwendeten Transkriptionsfaktor nur dann funktionell aktiv sind, wenn sie über Protein-Protein Interaktionen der Fusionsproteine zusammengebracht werden. In den vorgestellten Experimenten wurde die Interaktion unterschiedlicher Proteine analysiert, indem ein *bait*-Fusionsprotein (Köderprotein) bestehend aus der DNA-Bindedomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors und ein *prey*-Fusionsprotein (Beuteprotein) bestehend aus der Aktivierungsdomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors hergestellt und parallel in Hefezellen exprimiert wurden (s. Abb. 4.1). Die Entstehung eines funktionellen Transkriptionsfaktors GAL4, der durch die Interaktion der beiden Fusionsproteine entsteht, wurde als Transkription von Reportergenen wie z. B. β -Galaktosidase (β -Gal) gemessen, die direkt proportional der Interaktion der Hybridproteine ist (s. Abb. 4.1).

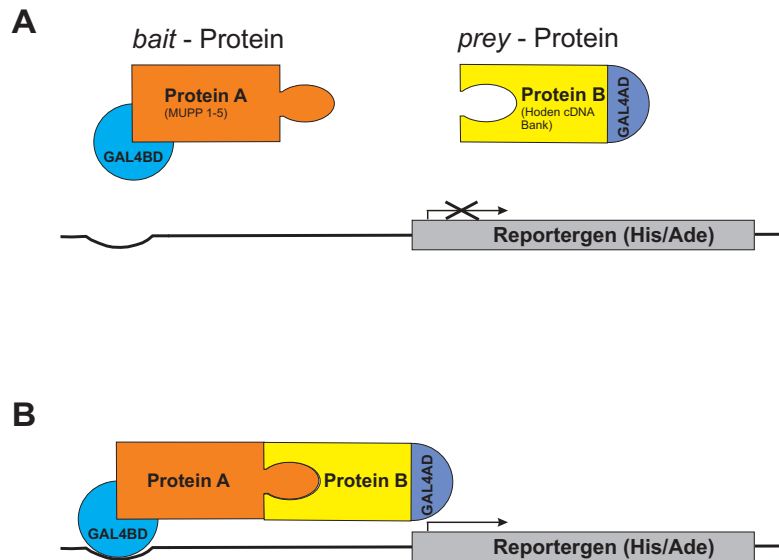


Abbildung 4.1: Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.

Das Hefe Zwei Hybrid System ist eine Technik zum Nachweis der Interaktion von Proteinen. Das allgemeine Prinzip beruht darauf, dass die funktionellen Domänen (Aktivierungs [AD] und Bindedomäne [BD]) des GAL4 Transkriptionsfaktors als unterschiedliche Fusionsproteine (*bait* - Protein (Köderprotein); *prey* - Protein (Beuteprotein)) exprimiert werden können ohne die Funktion des Transkriptionsfaktor zu zerstören. Alleine können die einzelnen Fusionsproteine die DNA Synthese nicht aktivieren, nur wenn es zu einer Interaktion der Beiden Fusionsproteine (A und B) kommt werden Aktivierungs- und Bindedomäne des Transkriptionsfaktors in räumliche Nähe zueinander gebracht, so dass dieser wieder funktionell aktiv ist und die Transkription eines Reportergens induziert.

4.4.2 Transformation von Hefezellen

Zur Transformation von Hefezellen wurde die Lithiumacetat Methode verwendet (Ito et al., 1983). Diese beruht darauf, dass alkalische Kationen Hefezellen kompetent für die Aufnahme von DNA-Molekülen machen (Schiestl and Gietz, 1989). Das inerte Polymer Polyethylenglykol (PEG), Lachsspermien-DNA und ein Hitzeschock für 15 min bei 42 °C sorgen zusätzlich für eine effiziente Aufnahme von DNA-Plasmiden in die Hefezellen (Ito et al., 1983), so dass es auf diese Art und Weise möglich ist fremde DNA in die Hefen einzubringen und dort effektiv zu exprimieren. Die für die Transformation verwendeten Vektoren tragen darüber hinaus Auxotrophiemarker, die es ermöglichen nach der Transformation ausschließlich auf Zellen zu selektionieren, die den gewünschten Vektor aufgenommen haben. Als Auxotrophiemarker werden in der Regel Gene verwendet, die für Schlüsselenzyme der Aminosäuren - oder des Nukleobasensyntheseweges kodieren, wie z.B. Gene für Enzyme aus dem Aminosäurestoffwechsel von Leucin (LEU2-Gen), Histidin (HIS3-Gen) oder Tryptophan (TRP1-Gen), oder aus dem des Stoffwechsels der Nukleobase Uracil (URA3-Gen).

Zur Transformation wurden 50 ml YPD (*yeast extract Peptone Dextrose*)-Medium (10g/l Hefeextrakt, 20g/l Pepton, 20g/l Glukose) mit dem zu transformierenden Hefestamm inokuliert und ü. N. bei 30 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 1,5 herangezogen. Die Hefesuspension wurde anschließend in 50 ml Zentrifugengefäße überführt, bei 3000 rpm für 3 min bei RT zentrifugiert, und das Präzipitat durch Resuspendieren in bestimmte Volumina an Lithiumacetatpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM Lithiumacetat [LiT]) der Anzahl der Transformationen angepasst, aufgenommen (z. B. 1300 µl = 13 Transformationen). Pro Transformationsansatz wurden 100 µl der in LiT-Puffer aufgenommenen Hefen in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 5 µl Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) versetzt. Zur Bildung von DNA Einzelsträngen wurde diese zuvor für 5 min bei 94 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Danach wurde 1 µg des zu transformierenden Vektors zu den Hefen gegeben, mit 500 µl LiT-PEG gut durchmischt und für 1h bei RT auf dem Überkopfroter inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl DMSO pro Ansatz wurden die Hefen zur Hitzeschockbehandlung für 15 min bei 42 °C im Wasserbad inkubiert, zum Sedimentieren für 30 s bei 3000 rpm zentrifugiert, in

100 μ l H₂O resuspendiert, auf Selektionsplatten ausplattiert und für 2 - 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

4.4.3 Hefe Verpaarung (*mating*)

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein einzelliger Organismus, der sowohl in der haploiden als auch in der diploiden Form vorkommen kann. Sowohl haploide als auch diploide Zellen können sich asexuell durch die Ausbildung von Tochterknospen vermehren (Sprossung). Haploide Zellen können zusätzlich durch das sogenannte *mating* mit anderen haploiden Zellen zu einer neuen diploiden Zellen verschmelzen (Sena et al., 1975). Ein wesentlicher Vorteil der klassischen Hefegenetik besteht darin, dass haploide Hefezellen trotz ihrer morphologischen Identität in zwei Paarungstypen (*mating types*), die man als MAT α bzw. MAT a bezeichnet, auftreten (Simon et al., 1995), wobei lediglich Hefen mit verschiedenen Paarungstypen fusionieren können (*mating*). Für die durchgeführten Paarungsstudien wurden die Hefestämme AH109 und Y187 mit den zwei *mating types* MAT a und MAT α verwendet.

Für die experimentelle Verpaarung (*mating*) im kleinen Maßstab wurden 500 μ l zweifach YPDA-Medium (20g/l Pepton, 20g/l Glukose, 10g/l Hefeextrakt, 40mg/l Adeninhemisulfat) mit je einer Einzelkolonie der Stämme AH109 und Y187 inokuliert und ü. N bei 30 °C und 280 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Hefesuspension zur Selektion auf neu entstandene diploide Zellen auf Platten mit Mangelmedien ausgestrichen und für 2 - 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Das Selektionsmedium wurde entsprechend der Auxotrophiemarker der verwendeten Expressionsvektoren ausgewählt.

cDNA-Bank Screen

Zum screenen einer transformierten cDNA-Bank aus Hodengewebe der Maus (clontech, Mountain View, USA) wurde das *mating* im großen Maßstab durchgeführt. Dazu wurde eine frische Kolonie des Hefestamms Y187, die den Vektor mit dem Köderprotein (MUPP1 PDZ Domänen 1-5) enthielt, in flüssiges Selektionsmedium (2 % Glukose, 1 % *Yeast Nitrogen Base*, 1 % entsprechende Dropout-Mischung)

ohne supplementiertes Tryptophan (-Trp) überführt und ü. N. bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Parallel wurde 1 ml Aliquot der Maus Hoden cDNA Bank ($> 1 \times 10^6$ unabhängige Klone), transformiert in AH109 Zellen (clontech, Mountain View, USA) im Wasserbad bei RT aufgetaut, zusammen mit 1 ml der Übernachtskultur des Köderstammes Y187 in einem 2 l Kolben überführt, mit 45 ml 2 x YPDA gemischt und für 20 - 24 h bei 50 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Hefesuspension in ein steriles 100 ml Zentrifugengefäß überführt, für 10 min bei 1000 g zentrifugiert und die sedimentierten Hefen in 10 ml 0,5 x YPDA aufgenommen. Zur Bestimmung der Effizienz der Verpaarung wurden je 100 μ l verschiedener Verdünnungen (1 : 10000, 1 : 1000, 1 : 100 und 1 : 10) der Hefezellsuspension auf Platten mit unterschiedlichen Selektionsmedien (SD -Leu, SD -Trp, SD -Leu -Trp) ausgestrichen. Zur Identifikation von neuen Bindungspartnern wurde die restliche Zellsuspension in 200 μ l Aliquots auf vierfach Selektionsplatten SD (-Ade -His -Leu -Trp) ausgestrichen. Alle Platten wurden für 3 bis 5 Tage bei 30 °C inkubiert und positive Klone zur weiteren Verifizierung erneut auf vierfach Selektionsplatten (-Ade -His -Leu -Trp) überstrichen und für weitere 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Für die anschließende Analyse wurden lediglich Klone verwendet, die auch in der zweiten Selektionsrunde ein Wachstum aufwiesen.

4.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe

Zur weiteren Analyse des Hoden-cDNA Screens (s. 4.4.3) musste die Plasmid-DNA mit dem entsprechenden Beute-Vektor aus den positiven Hefeklonen isoliert werden (Hoffman and Winston, 1987).

Dazu wurden je 10 ml des flüssigen Selektionsmediums (- Leu, - Trp, - His, - Ade) mit einer frischen Kolonie des zu untersuchenden Klons inokuliert und ü. N. bei 30°C bis zu einer $OD_{600} > 1.0$ inkubiert. Die gewachsenen Hefen wurde für 20 s bei 13.000 rpm zentrifugiert, in 1 ml H₂O resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch eine erneute Zentrifugation für 20 s bei 13.000 rpm wurden die Hefen sedimentiert, in 150 μ l *breaking buffer* (2 % Triton X 100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8,0) aufgenommen, mit in Säure gewaschenen Glaskügelchen, und zusätzlich mit 150 μ l Phenol/Chloroform zur direkten Extraktion der DNA versetzt. Zum vollständigen Aufschluss der Zel-

len wurden die Ansätze 8 mal für exakt 30 s mit Hilfe eines Vortexers heftig gemischt, dabei konstant auf Eis gekühlt und noch für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Durch eine anschließende Zentrifugation für 15 min bei 12.000 rpm und 4 °C trennte sich die Suspension in zwei Phasen: Die obere wässrige Phase mit der gelösten DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt, gemischt und erneut für 15 min bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die obere Phase wurde zur Fällung der Plasmid-DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit einem 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 5,2 und dem 2,5 fachen Volumen 100 % igem Ethanol versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Zum Sedimentieren der präzipitierten DNA wurde das Gemisch für 15min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, das Sediment mit 70 % igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet, in 50 μ l H₂O aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.4.5 Analyse der identifizierten Hefeklone mit Hilfe einer PCR Strategie

Um die positiven Klone weiter analysieren zu können wurde auf die isolierte Plasmid-DNA der jeweiligen Klone eine PCR mit Primer für die 3' bzw. 5' Flanken des enthaltenen Vektors durchgeführt. Für die PCR Reaktion wurde folgender Ansatz hergestellt: 1 μ l *forward* primer, 1 μ l *reverse* primer, 2,5 μ l 10 x PCR Puffer (750 mM Tris-HCl [pH 8.8 at 25 °C], 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% [v/v] Tween 20), 1 μ l dNTPs, 1 μ l Taq Polymerase (5 U/ μ l Fermentas St. Leon Roth), 3 μ l 1:10 - 1:100 verdünnte Hefe - DNA, und mit H₂O auf 25 μ l Endvolumen aufgefüllt. Zur Amplifikation des DNA-Fragmentes wurde folgendes Temperaturprofil gefahren: 95 °C 5 min, 40 Zyklen a 94 °C 45 s, 58 °C 45 s, 72 °C 45 s; zum Auffüllen der DNA-Fragmente folgten anschließend 72 °C für 7 min. Zum Sequenzieren der amplifizierten DNA-Fragmente wurden die PCR-Reaktionen über eine Agarose Gel-Elektrophorese wie unter 4.2.5 beschrieben aufgetrennt, entsprechende Banden aus der Agarose ausgeschnitten und wie unter 4.2.6 beschrieben eluiert. Von der eluierten DNA wurden anschließend 10 - 20 μ l zum Sequenzieren an die Firma MWG (München) geschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Blast und einem Sequenzabgleich mit bekannten Sequenzen in der Datenbank verglichen

und auf Homologien untersucht.

4.5 Proteinbiochemische Methoden

4.5.1 Präparation von Membran - und cytosolischen Proteinfraktionen

Für die Gewinnung von Membranfraktionen wurde das entsprechende Gewebe (Cortex, Hoden, Nebenhoden, Spermien) aus der Ratte bzw. der Maus freipräpariert, in ein entsprechendes Volumen (2 - 9 ml) Homogenisationspuffer (10 mM Tris / HCl pH 7,4, 3 mM MgCl₂, 2 mM EGTA) plus 1:100 eines Protease Inhibitor Sets III (100 mM AEBSF, 80 µM Aprotinin, 5 mM Bestatin, 1,5 mM E-64, 2 mM Leupeptin, 1 mM Pepstatin A, [Calbiochem, Darmstadt]) überführt, in einem Dounce-Homogenisator auf Eis homogenisiert und dreimal für 5 - 10 s mit dem Ultraschallstab beschallt. Durch eine Zentrifugation bei 1000 g und 4°C wurden Zellkerne und intakte Organellen von den im Überstand befindlichen cytosolischen Zellkomponenten bzw. Membranproteinen getrennt. Zur Gewinnung der Membranfraktion aus dem Überstand wurde dieser erneut für 2 h bei 50.000 g und 4 °C zentrifugiert; der resultierende Überstand mit den vorwiegend löslichen Proteinen (S2) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt; die Membranen im Pellet (P2) wurden je nach Größe des Sediments in 50 - 250 µl PBS (150 mM NaCl, 1,4 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄) resuspendiert. Beide Fraktionen wurden bis zum endgültigen Gebrauch bei -80 °C gelagert; die Proteinkonzentration in den separierten Fraktionen wurde nach Bradford bestimmt.

4.5.2 Isolation von *detergent-insoluble glycolipid-enriched membrane complexes* DIGs

Lipid rafts sind distinkte Domänen der Plasmamembran, die einen hohen Anteil an Cholesterin, Glykolipiden und Sphingolipiden enthalten (Simons and van Meer, 1988) und sich durch eine geringere Fluidität gegenüber anderen Bereichen der Plasmamembran auszeichnen (Simons and Ikonen, 1997). Sie sind an einer Reihe von zellulären Prozessen wie der Zellmigration (Gómez-Moutón et al., 2004), am

Transport von Proteinen und Lipiden (Helms and Zurzolo, 2004), und an Signaltransduktionskaskaden beteiligt (Simons and Ikonen, 1997).

Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von DIGs

Lipid rafts lassen sich durch ihren hohen Gehalt an Glykosphingolipiden und Cholesterol und der daraus resultierenden geringen spezifischen Dichte sowie der Unlöslichkeit in nicht-ionischen Detergenzien wie z. B. Triton X-100 über einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten isolieren, wobei die DIGs sich zwischen der 5 % igen und der 30 % igen Schicht im Gradienten anreichern (Iwabuchi et al., 1998).

Zur Isolation von *lipid rafts* aus Hirngewebe wurde ein einzelner Cortex der Ratte in zweimal Isolationspuffer (500 mM NaCO₃, pH 11,5) supplementiert mit 1:100 eines Protease Inhibitor Sets III (100 mM AEBSF, 80 µM Aprotinin, 5 mM Bestatin, 1,5 mM E-64, 2 mM Leupaptin, 1 mM Pepstatin A, [Calbiochem, Darmstadt]) im Dounce-Homogenisator homogenisiert und anschließend dreimal für 20 s mit dem Ultraschallstab beschallt. Vom entstandenen Lysat wurde je 1 ml in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und mit je 1 ml einer 80 %igen Saccharoselösung in MBS Puffer (25 mM Mes, 0,15 M NaCl, pH 6,5) vorsichtig gemischt. Darüber wurde ein Gradient bestehend aus 6,5 ml einer 35 % igen Saccharoselösung in MBS Puffer und 3,5 ml einer 5 % igen Saccharoselösung in MBS Puffer geschichtet und für 20 h bei 41.000 rpm und 4 °C in einer Ultrazentrifuge (Beckman, L7-55, SW55 Rotor) zentrifugiert. Der Gradient wurde in 1 ml Fraktionen vorsichtig von oben abgenommen und in frische Reaktionsgefäße aliquotiert.

Um die Effizienz der DIG- Isolierung zu überprüfen, wurden anschließend jeweils gleiche Volumina jeder Fraktion in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit einem Marker für DIGs, (Caveolin1) bezüglich der Anreicherung in der Grenzschicht zwischen der mittleren und niedrigen Saccharosekonzentration analysiert.

Isolation von DIGs auf Grund der Triton X-100 Unlöslichkeit

Neben der geringen spezifischen Dichte zeichnen sich *lipid rafts* dadurch aus, dass sie bei 4 °C in nicht-ionischen Detergentzien (z.B. 1 %iges Triton X-100) unlöslich sind (Lisanti et al., 1995). Dadurch lassen sich Proteine, die an *raft* cluster assozi-

iert sind, relativ leicht von Detergenz-löslichen Membrankompartimenten trennen. In der vorliegenden Arbeit wurden DIGs aus Ratten-Cortex und -Spermien isoliert. Dazu wurden die Nebenhoden von 2 - 3 Ratten bzw. der Cortex einer Ratte freipräpariert und in 6 - 9 ml Homogenisationspuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 3 mM MgCl₂, 2 mM EGTA) plus 1:100 des Protease Inhibitor Sets III (100 mM AEBSF, 80 μ M Aprotinin, 5 mM Bestatin, 1,5 mM E-64, 2 mM Leupaptin, 1 mM Pepstatin A, [Calbiochem, Darmstadt]) überführt. Mit Hilfe eines Skalpells wurden die Nebenhoden angeschnitten, und die Spermien für 30 min bei 37 °C in den Puffer schwimmen gelassen. Anschließend wurden sowohl die Spermien suspension als auch der Cortex homogenisiert und mit dem Ultraschallstab beschallt. Zum Abtrennen von intakten Zellkernen und Zytoskelettkomponenten wurde das Lysat für 10 min bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert. Um die Membranen aus dem löslichen Überstand aufzureinigen, wurde dieser in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 2 h bei 50.000 g oder alternativ für 1 h bei 100.000 g und 4 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (s. Abb.4.2 P₅₀). Zur Extraktion der DIGs aus der Membranfraktion wurden die Membranen in 200 - 300 μ l PBS/1,5 % Triton X-100 resuspendiert, für 30 min bei 4 °C in einem Überkopffrotor inkubiert und anschließend zur Trennung der Detergenz-löslichen von den unlöslichen Membrananteilen für 2 h bei 50.000 g und 4 °C zentrifugiert (s. Abb.4.2 P_{TX}, S_{TX}). Die Triton X-100 löslichen Membrananteile (S_{TX}) im Überstand wurden nach der Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die unlöslichen Anteile im Sediment (P_{TX}) in 20 - 50 μ l PBS resuspendiert. Von beiden Fraktionen wurde anschließend die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt und auf die Assoziation mit DIGs mit Hilfe der Westernblot-Technik untersucht. Als Marker für aufgereinigte DIGs diente das integrale Membranprotein Caveolin 1 (Kurzchalia and Parton, 1999).

4.5.3 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung wurde die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) verwendet. Diese beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Blau G250 mit basischen Aminosäuren interagiert und so einen Farbkomplex bildet. Durch diese Interaktion verschiebt sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffes von 495 nm auf 595 nm, so dass die Konzentration einer unbekannten

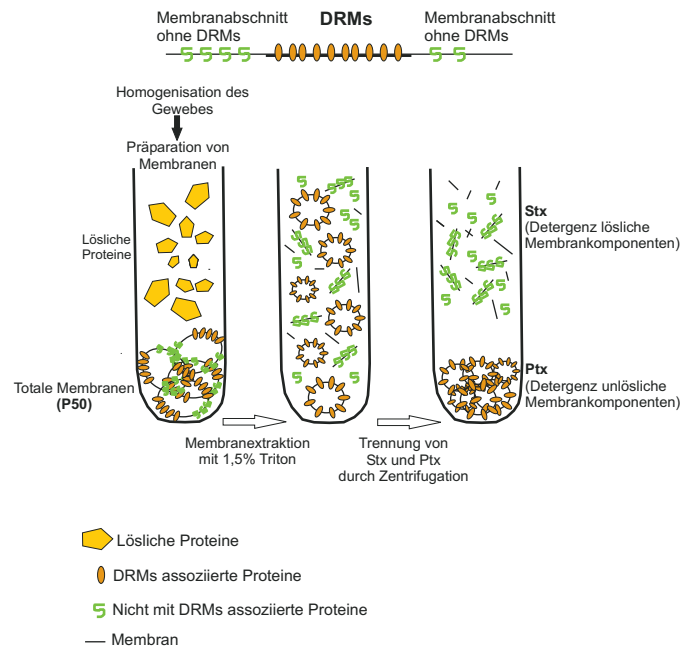


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Aufreinigung von *lipid rafts* mit Hilfe des nicht ionischen Detergenz Triton X-100.

Lipid rafts zeichnen sich dadurch aus, dass sie aufgrund ihres hohen Cholesterolgehalts in nicht-ionischen Detergenzien wie z.B. Triton X-100 unlöslich sind. Für die Isolation von *raft clustern* wurden durch eine Zentrifugation bei 50.000 g Membranen sedimentiert. Aus dem Membrangemisch wurden anschließend durch die Zugabe von PBS/1,5 % Triton X-100 und der Inkubation bei 4°C die Detergenz-unlöslichen Membrankomponenten extrahiert. Durch eine erneute Zentrifugation bei 50.000 g wurden dann die unlöslichen (*lipid rafts* P_{TX}) von den löslichen Komponenten (S_{TX}) getrennt.

Proteinlösung mit Hilfe einer Standardkurve mit definierten Proteinmengen (z. B. des Bovinen Serum Albumin [BSA]) exakt bestimmt werden kann. Die Eichkurve wurde zu Beginn einmal angefertigt. Anschließend wurde um die Proteinkonzentration in einer unbekannten Probe zu bestimmen, wurde jeweils parallel zur analysierenden Probe eine BSA Konzentration, die im linearen Bereich der Standardkurve lag (z. B. 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) als Referenzprobe eingesetzt.

Im einzelnen wurden für die Proteinbestimmung 2 μl der zu bestimmenden Proteinlösung mit 98 μl H_2O und 1,5 ml Bradford Reagenz (5 ml Coomassie Stamm-lösung [250 mg Coomassie Blau G250 in 250 ml 100 % Ethanol], 10 ml Phosphorsäure, 85 ml H_2O) versetzt. Parallel wurde eine Leerwert-Probe ohne Protein und eine Referenzprobe mit 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA angesetzt. Alle Proben wurden in einem dreifachen Ansatz hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurde

die Extinktion der Proben bei 595 nm im Photometer gemessen. Aufgrund der bekannten Konzentration des BSA Standards konnte anschließend die Proteinkonzentration der Proteinlösung errechnet werden.

4.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine über ein Sammelgel konzentriert und dann im darunter liegenden Trenngel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt werden können (Laemmli, 1970). Das ist deshalb möglich, da die Eigenladung des zu analysierenden Proteins, die die Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld normalerweise mit bestimmen würde, durch einen Überschuss an dem anionischen Detergenz Natriumlaurylsulfat (SDS) überlagert ist, so dass alle Proteine unabhängig von ihrer Aminosäurekomposition in etwa gleich negativ geladen sind.

Als Trägermaterial zur Trennung eines Proteingemisches wurde Polyacrylamid verwendet, das durch Co-Polymerisation von Acrylamid mit N,N'-Methylenbisacrylamid als Quervernetzer jeweils direkt vor Versuchsbeginn hergestellt wurde. Da die Größenordnung der Polypeptide, die in einem Acrylamidgel aufgetrennt werden können, von der Konzentration des Polyacrylamids und dem jeweiligen Vernetzungsgrad abhängt, wurde die Porengröße des Trenngels der jeweils zu analysierenden Proteinprobe angepasst und lag in der Regel zwischen 7 und 10 %. Die Porengröße des Sammelgels lag jeweils bei 3 % Acrylamid (Laemmli, 1970). Vor der Auftrennung wurden die Proteinproben zunächst mit vierfach Probenpuffer (250 mM Tris/HCl, pH 6,8, 0,08 % Bromphenolblau, 8 % SDS, 20 % Glycerin, 10% β -Mercaptoethanol) versetzt und für 5 min bei 94°C erhitzt. Diese Behandlung bewirkte eine vollständige Entfaltung und Denaturierung der Proteine sowie eine Spaltung in entsprechende Untereinheiten. Für ein 7 % iges Trenngel wurden parallel folgende Komponenten gemischt und zwischen zwei Glasplatten, die in einer Gelapparatur eingespannt wurden, gegossen: 3,5 ml 30 % Acrylamid 0,8 % Bisacrylamid, 3,75 ml vierfach Trenngelpuffer (1 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 8,8), 7,75 ml H₂O, 100 μ l Ammoniumpersulfat (APS), 20 μ l TEMED. Für 10 % ige Gele wurden die Volumina von Acrylamid und H₂O entsprechend angepasst. Während der Polymerisation wurde das Trenngel vorsichtig mit Isopropanol überschichtet.

Nach dem Polymerisieren wurde der Alkohol sorgfältig entfernt, das Sammelgel (1 ml 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid, 1,25 ml vierfach Sammelgelpuffer [0,5M Tris, 0,4 % SDS, pH 6,8], 50 μ l APS, 10 μ l TEMED) auf das bereits feste Trenngel gegossen und zum Auftragen der Proben mit einem Teflonkamm versetzt. Nach dem Aushärten wurde das Gel je nach Versuchansatz mit 5 - 80 μ g Protein und 10 μ l eines Proteinstandards (*Prestained page ruler*, Fermentas, St. Leon Roth) beladen und die jeweiligen Proteingemische bei einer konstanten Stromstärke von 80 bis 120 mV der Größe nach aufgetrennt.

4.5.5 Westernblot-Technik

Die Westernblot - oder Immunoblot-Technik ermöglicht es, das hohe Auflösungsvermögen der Gelelektrophorese mit der Selektivität einer Antigen/Antikörper-Reaktion zu kombinieren. Dazu ist es notwendig, die Proteine aus dem Gel auf eine geeignete Matrix zu überführen, so dass sie für einen immunologischen Nachweis mit spezifischen Antikörpern zugänglich sind (Towbin et al., 1979). Als Trägermaterial für einen Immunoblot eignen sich vor allem Nylon- oder Nitrocellulosemembranen. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgt durch Elektrotransfer, der sich im Gegensatz zum Kapillarblotting durch eine wesentlich stärkere Effizienz auszeichnet (Towbin et al., 1979). In der vorliegenden Arbeit wurde die Filter - oder Trocken (semi-dry) Blotting Transfertechnik eingesetzt. Dabei werden das Gel und die Membran sandwichartig, zwischen, als Ionenreservoir fungierende Filterpapiere, gelegt, zwischen die beiden Elektroden gestapelt und ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung der Proteine im Gel angelegt. Damit entsteht auf der Nitrocellulosemembran ein genaues, aber spiegelbildliches Abbild des ursprünglichen Bandenmusters im Acrylamidgel. Für den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran wurde ein diskontinuierliches Puffersystem bestehend aus den folgenden Puffern eingesetzt: Anodenpuffer I: 0,3M Tris, 20 % (v/v) Methanol; Anodenpuffer II: 0,025 M Tris, 20 % (v/v) Methanol; Kathodenpuffer: 40 mM Amino-Caprone, 20 % (v/v) Methanol. Der Blot wurde mit Hilfe von Filterpapieren und den beschriebenen Puffern folgendermaßen aufgebaut: Auf die Kathode wurden zunächst 9 Filterpapiere, die mit dem Kathodenpuffer befeuchtet waren, gelegt, auf die dann vorsichtig das Acrylamidgel

geschichtet wurde. Darüber wurden 3 mit Anodenpuffer II und 6 in Anodenpuffer I befeuchtete Filterpapiere gestapelt und direkt unter der Anode plaziert. Bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/pro cm² Gel wurden die Proteine aus dem Gel für 90 - 120 min auf die Membran übertragen, nach dem Transfer zur Visualisierung der transferierten Proteine für ca. 1 - 2 min mit Ponceau S (0,2 % [w/v] Ponceau S in 3 % Trichloressigsäure) angefärbt und kurz mit H₂O gewaschen. Anschließend wurden die Membranen entweder direkt zum Immunnachweis verwendet oder getrocknet und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.5.6 Immunodetektion

Zum Proteinnachweis der auf der Nitrocellulosemembran immobilisierten Proteine wurde das *Enhanced Chemoluminescence System* (ECL) verwendet; die Detektion der zu analysierenden Antigene erfolgte durch mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelten, Spezies-spezifischen Sekundärantikörpern. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran mit den geblotteten Proteinen zuerst zum Entfernen überschüssiger Ponceau S Lösung in TBST (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % [v/v] Tween-20, pH 7,4) zweimal für 10 min bei RT gewaschen und anschließend zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % (w/v) Milchpulver in TBST für 30 min bei RT abgesättigt. Für den Immunnachweis wurde die Membran mit dem entsprechenden Primär-Antikörper in der angegebenen Verdünnung in 3% Milchpulver (s. Tab. 3.9) ü. N. bei 4 °C inkubiert. Durch dreimaliges Waschen für 10 min mit TBST bei RT wurde überschüssiger Primärantikörper entfernt, und die Membran mit einem Sekundärantikörper (Verdünnungen s. Tab. 3.10) inkubiert. Nach 1 h bei RT wurde überschüssiger, nicht gebundener Antikörper erneut durch dreimaliges Waschen für je 10 min bei RT entfernt, und der gebundene sekundäre Antikörper durch das ECL-System nachgewiesen. Dazu wurde die Membran für eine Minute mit dem ECL Gemisch inkubiert (S1: 80 ml H₂O, 10 ml 1 M Tris/HCl pH 8,5, 1 ml Luminolstocklösung [444 mg Aminophthalhydrazide in 10 ml DMSO], 0,44 ml Stabilisatorlösung [0,15 g p-coumaicid in 10 ml DMSO] auf 100 ml aufgefüllt; S2: 80 ml H₂O, 10 ml Tris/HCl pH 8,5, 60 µl 30 % H₂O₂, auf 100 ml) anschließend zwischen zwei durchsichtige Folien fixiert und in eine lichtundurchlässige Röntgenkassette gelegt. Je nach verwendetem Primärantikörper wurde ein

Hyper-ECL-Film (Amersham Bioscience Europe, Freiburg) für 1 - 30 min aufgelegt, der Film mit Dokumol (Tetenal, Norderstedt) entwickelt, kurz in Wasser gespült und anschließend in einer Lösung aus 1,26 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, 0,11 M Kaliumdisulfid fixiert.

4.5.7 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Neben dem spezifischen Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern können Proteine auch direkt im SDS-PAGE sichtbar gemacht werden. Dazu verwendet man den Farbstoff Coomassie Blau G250, der mit basischen Aminosäuren von Proteinen interagiert und diese so sichtbar macht (Bennett and Scott, 1971).

Dazu wurde das Proteingel mit einer Coomassie Blau-Färbelösung (50 % Methanol, 7 % Essigsäure, 0,02 % Coomassie Blau G250) auf einem Taumelschüttler (WT 17, Biometra, Göttingen) für 2 - 4 h bei RT inkubiert und zum Entfernen überschüssiger Färbelösung bis zum Erkennen der separierten Proteinbanden in Entfärberlösung (20 % Methanol, 7 % Essigsäure) weiter geschüttelt.

4.6 Immuncytochemische Untersuchungen an Spermien

Um die subzelluläre Lokalisation von Proteinen auf Ebene der Spermien bestimmen zu können, wurde das indirekte Immuncytochemie-Verfahren durchgeführt. Dazu wurden isolierte und permeabilisierte Spermien mit einem spezifischen Primärantikörper bzw. einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper, der wiederum den Primärantikörper spezifisch erkennt, inkubiert. Die Auswertung erfolgte an einem Konfokalen Mikroskop (Zeiss, Jena) oder an einem Axivision (Zeiss, Jena).

4.6.1 Herstellung von Spermienpräparaten für die Mikroskopie

Für die Herstellung von Spermienpräparaten wurden die Nebenhoden einer Ratte bzw. einer Maus freipräpariert, in HS *working solution* (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 2 mM CaCl_2 , 5 mM Glukose, 30 mM HEPES, 10 mM Lactat,

1 mM Pyruvat, pH 7,4) gewaschen und anschließend in eine Petrischale mit 2 ml HS/NaHCO₃/BSA Puffer (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 5 mM Glukose, 30 mM HEPES, 10 mM Lactat, 1 mM Pyruvat, pH 7,4, 15 mM NaHCO₃ 0,5 % BSA) überführt. Um vorwiegend motile Spermien zu isolieren, wurde der caudale Teil des Nebenhodens vorsichtig mit einem scharfen Skalpell eingeschnitten, so dass die Spermien während der anschließenden Inkubation von 20 min bei 37 °C in den umgebenden Puffer schwimmen konnten. Die Spermien-suspension wurde daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 2100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Spermien zweimal mit 250 μ l PBS gewaschen und in einem Endvolumen von 250 μ l pro Nebenhoden vorsichtig resuspendiert. Abhängig von der Dichte der Spermien wurden 10 - 15 μ l der Suspension pro Präparat auf einem Glasobjektträger ausgestrichen, an der Luft getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Die Nebenhoden geschlechtsreifer Bullen wurden vom Schlachthof Marburg zur Verfügung gestellt. Die Isolierung der Spermien wurde analog zu der Isolierung von Maus - und Rattenspermien durchgeführt (s. o.). Aufgrund der Größe des Nebenhodens wurde zur Gewinnung der Spermien allerdings nur ein Teil des Organs in HS/NaHCO₃/BSA Puffer (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 5 mM Glukose, 30 mM HEPES, 10 mM Lactat, 1 mM Pyruvat, pH 7,4, 15 mM NaHCO₃ 0,5 % BS) überführt.

Humane Spermien wurden von jungen, gesunden Spendern zur Verfügung gestellt und zunächst vom Seminalplasma befreit. Dazu wurde das Ejakulat mit dem neunfachen Volumen an PBS gemischt, bei 2100 rpm und RT zentrifugiert, die Zellen mit 3 ml auf 37 °C vorgewärmtes PBS überschichtet und für 25 min bei 37 °C inkubiert. Während dieser Inkubation schwammen die vitalen Spermien aktiv in die obere wässrige Phase, die dann in 10 - 15 μ l Aliquots auf die Objektträger (OTs) ausgestrichen und an der Luft getrocknet wurden.

4.6.2 Indirekte immuncytochemische Färbungen

Für die immuncytochemische Färbung der Spermien wurden die auf einem Glasobjektträger getrockneten Spermien zunächst für 5 min in PBS rehydriert. Zur

Fixierung und Permeabilisierung der Spermien wurden die Objektträger in kaltes Methanol (-20 °C) überführt, für 2 min inkubiert, dreimal für 5 min in PBS gewaschen und zum Blocken von unspezifischen Bindestellen für 30 min mit 10% igem fötalem Kälberserum (FCS) in PBS (10 % FCS/PBS) bei RT inkubiert. Zum Nachweis eines bestimmten Proteins wurde der entsprechende Primärantikörper (Verdünnung siehe 3.9, S.32) in 10 % FCS/PBS verdünnt auf die Objektträger gegeben, und die Präparate dann in einer feuchten Kammer ü. N. bei 4°C inkubiert. Nicht gebundener Primärantikörper wurde durch drei Waschschr itte für je 5 min in PBS entfernt. Zur Detektion des gebundenen Primärantikörpers wurde ein entsprechender Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper in 10 % FCS/PBS verdünnt, und die Präparate wiederum in einer feuchten lichtundurchlässigen Kammer für 1 h bei RT inkubiert. Die konjugierten Fluochrome waren FITC (Anregung 495 nm; Emission 517nm) oder Alexa 546 (Anregung 556 nm; Emission 573 nm). Nach der Inkubation wurde ungebundener, überschüssiger Sekundärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt, und die Präparate zur Visualisierung des Nukleus mit dem DNA interkalierenden und rot fluoreszierenden Farbstoff Propidiumjodid in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert. Zur Kernfärbung wurden die Spermien abhängig von ihrer Spezies unterschiedlich lange in der Lösung inkubiert (Maus: 5 min, Ratte: 7 min, Bulle: 10 min, Mensch: 7 s). Die überschüssige Propidiumjodid-Lösung wurde erneut durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt, und die Präparate mit Deckgläschen und Fluoreszenz Eindeckelmedium (Dako Cytomation, Hamburg) konserviert. Die Analyse der einzelnen Färbungen erfolgte am Laser Scanning Mikroskop (LSM 540 Meta, Zeiss).

4.7 Funktionelle Untersuchungen zur Calcium vermittelten acrosomalen Exocytose an Mausspermien

4.7.1 Streptolysin O (SLO) Ansatz

Da Spermien genetischen Methoden wie siRNA-Techniken oder klassischen Überexpressionsverfahren auf Grund ihrer fehlenden Proteinbiosynthese nicht zugäng-

lich sind (Carreau et al., 2007), wird die funktionelle Rolle von Proteinen an der Akrosomenreaktion in jüngster Zeit an mit Streptolysin O-permeabilisierten Spermien und inhibitorisch-wirkenden Antikörpern untersucht (zur Übersicht s. (Mayorga et al., 2007)). Streptolysin O, ein Bestandteil der Zellwände von *Streptococcus pyogenes*, interagiert mit Cholesterinhaltigen Membranen und führt über eine zusätzliche Lateralaggregation von Toxinmonomeren zur Ausbildung von Poren in der behandelten Plasmamembran (Bhakdi et al., 1985). Die eigentliche akrosomale Exocytose wird nach der Inkubation mit der entsprechenden Antikörperverdünnung durch eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration ausgelöst. Die Erfassung der Rate akrosomierter Spermien erfolgt anschließend durch eine Färbung des Präparates mit Commassie Blau R250, das die noch intakten akrosomalen Vesikel aufgrund ihrer hohen Proteindichte tiefblau anfärbt (Lu et al., 2002). Um die Funktion des Adapterproteins MUPP1 während der Akrosomenre-

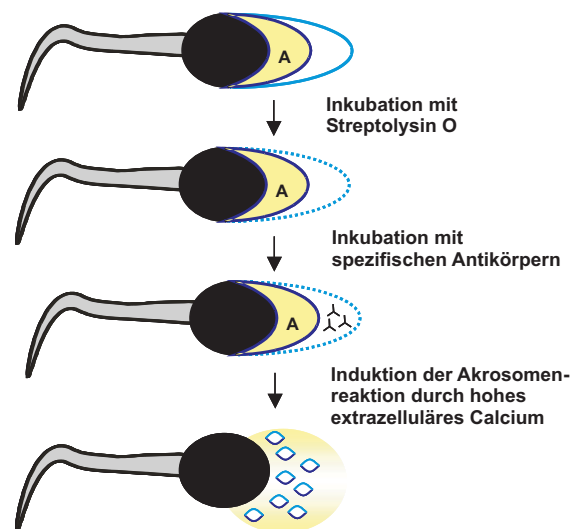


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung von funktionellen Studien zur Calcium vermittelten akrosomalen Exocytose an Mausspermien mit Hilfe von Streptolysin O permeabilisierten Spermien.

Da Spermien genetischen Methoden wie z.B. siRNA-Techniken nicht zugänglich sind, wurde ein Ansatz gewählt, bei dem das zu analysierende Protein aufgrund einer sterischen Blockierung durch einen Antikörper funktionell inhibiert wird. Dabei werden die Spermien zunächst mit dem bakteriellen Toxin Streptolysin O permeabilisiert. Durch das Toxin entstehen so große Poren in der Plasmamembran der Zelle, dass Antikörper zwar in die Zelle hinein kommen, das Spermium aber noch funktionell aktiv bleibt. Aufgrund der Poren in der Plasmamembran kann anschließend die Akrosomenreaktion durch eine Erhöhung des extrazellulären Calciums direkt ausgelöst werden.

aktion in Mausspermien zu untersuchen, wurden die freipräparierten Nebenhoden einer Maus in HS *working solution* (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 2mM CaCl₂, 5 mM Glukose, 30 mM HEPES, 10 mM Lactat, 1 mM Pyruvat, pH 7,4) gewaschen und in 2 ml HS/NaHCO₃/BSA Puffer (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 5 mM Glukose, 30 mM HEPES, 10 mM Lactat, 1 mM Pyruvat, pH 7,4, 15 mM NaCO₃, 0,5% BSA [w/v]) überführt. Die Spermien wurden aus den Samenkanälchen des caudalen Teils des Nebenhodens rausgedrückt, für 1,5 h bei 37 °C im Inkubator kapazitiert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 2100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Spermien mit 1 ml PBS gewaschen und erneut für 5 min bei 2100 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Spermien zur Anlagerung des Streptolysin O (SLO) an die Plasmamembran mit 0,5 U/ml SLO in PBS für 15 min bei 4 °C inkubiert, erneut bei 2100 rpm zentrifugiert und in 2 ml Sucrosepuffer (250 mM Sucrose, 0,5 mM EDTA, 20 mM HEPES) resuspendiert. Durch die anschließende Inkubation für 20 min bei 37 °C wurde das an die Plasmamembran gebundene SLO aktiviert, so dass es anschließend zur Ausbildung heterogener Poren in der Plasmamembran der Spermien kommt. Zur Inkubation mit ausgewählten Antikörpern wurde die Spermien suspension nach der Permeabilisierung in 200 µl Aliquots aufgeteilt und mit je 4 µl (1 : 50 Verdünnung) der zu analysierenden Antikörper (anti-MUPP1, anti-Rab3A, anti-Caveolin1, anti-Syntaxin 2) für 20 min bei 37 °C inkubiert. Parallel dazu wurden jeweils zwei Ansätze lediglich mit dem entsprechenden Verdünnungspuffer inkubiert.

Zur Induktion der Akrosomenreaktion wurden alle Proben bis auf einen Ansatz ohne Antikörper (Negativkontrolle) mit 5 mM extrazellulärem Calcium versetzt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Um die Effizienz der inhibitorischen Wirkung der applizierten Antikörper zu quantifizieren, wurden die Spermien einmal mit 200 µl PBS gewaschen, in 900 µl Fixier-Puffer (20 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 7,5% Paraformaldehyd) resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Zum Ausstreichen der fixierten Spermien auf Objektträger wurden die Spermien für 1 min bei 13.000 rpm sedimentiert, in 500 µl Post-Fix Puffer (100 mM Ammoniumacetat pH 9.0) gewaschen, erneut für 1 min bei 13.000 rpm sedimentiert, auf Objektträger aufgetragen und dort trocknen gelassen. Die getrockneten Spermien wurden mit Coomassiefärbelösung (0.04 % Coomassie Blau R250, 50 ml Methanol, 10 ml

Essigsäure, 40 ml H₂O) überschichtet, für 5 min inkubiert, in H₂O gewaschen und in Kaisers Glyceringelatine (Sigma, Deisenhofen) eingedeckelt. Jeweils 100 bis 200 Spermien pro Objektträger wurden anschließend auf das Vorhandensein eines intakten Akrosoms hin überprüft, wobei die Beschriftung der Objektträger vorher abgeklebt wurde, so dass ein blindes Auszählen gewährleistet war. Zur Auswertung wurden von den ermittelten Werten die spontane Akrosomenreaktionsrate abgezogen und als Prozent der Induktion der Positivkontrolle dargestellt. Für die Signifikanzberechnung wurde der studentische-T-Test verwendet, dabei wurden folgende Signifikanzniveaus herangezogen: $p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***
Kapazitierte aber nicht permeabilisierte Spermien wurden mit verschiedenen Konzentrationen der membrangängigen Inhibitoren W7 (20 - 100 μ M), KN93 (200 - 600 nM) und dem inaktiven Analog (600 nM) für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Akrosomenreaktion mit 10 μ M des Calciumionophors A23187 ausgelöst. Nach einer erneuten Inkubation bei 37 °C für 20 min wurden die Spermien einmal mit PBS gewaschen, fixiert, auf OT ausgestrichen, wie oben bereits beschrieben mit Coomassie Blue gefärbt und ausgezählt.

4.7.2 Sequestrierung des akrosomalen Calciums durch den Licht-sensitiven Calcium-Chelator NP-EGTA-AM

Die akrosomale Exocytose zeichnet sich durch einen mehrphasigen Verlauf aus, der sich in zwei aufeinander folgenden Calcium-Signalen widerspiegelt (siehe Einleitung). Die Stimulierung mit ZP3 bewirkt einen anhaltenden Einstrom von extrazellulärem Calcium ins Cytosol der Zelle, der eine Vorbereitung des Vesikels für die Exocytose bewirkt (Anheften/Reifen). Gleichzeitig leitet das erhöhte cytosolische Calcium die zweite Phase der Akrosomenreaktion ein, einen massiven Ausstrom von Calcium aus dem Akrosom, der über eine Destabilisierung des SNARE-Synaptotagmin Komplexes zur eigentlichen Fusion des akrosomalen Vesikels führt (Mayorga et al., 2007)(Blas et al., 2005).

Um zu prüfen, ob Proteine, die funktionell an der Akrosomenreaktion beteiligt sind, entweder am Anheften und Reifen des Vesikels oder an der Fusion der Membranen beteiligt sind, wurde der mehrphasige Prozess der akrosomalen Exocytose

durch die Chelatierung des akrosomalen Calciums zu einem definierten Zeitpunkt reversibel unterbrochen. Dazu wurde der Licht-sensitive und Membran-permeable Calcium-Chelator NP-EGTA-AM eingesetzt (Branham et al., 2006). Durch Belichtung mit UV-Licht wurde, nach einer Inkubation mit inhibitorischen Antikörpern, die kontrollierte Calcium-induzierte Exocytose nach dem Anheften des Vesikels an die Plasmamembran fortlaufen gelassen (Iida et al., 1999), so dass es möglich war zu überprüfen, an welcher der beiden zeitlich aufeinander folgenden Prozesse der Exocytose das zu analysierende Protein beteiligt ist (Tomes et al., 2005). Für

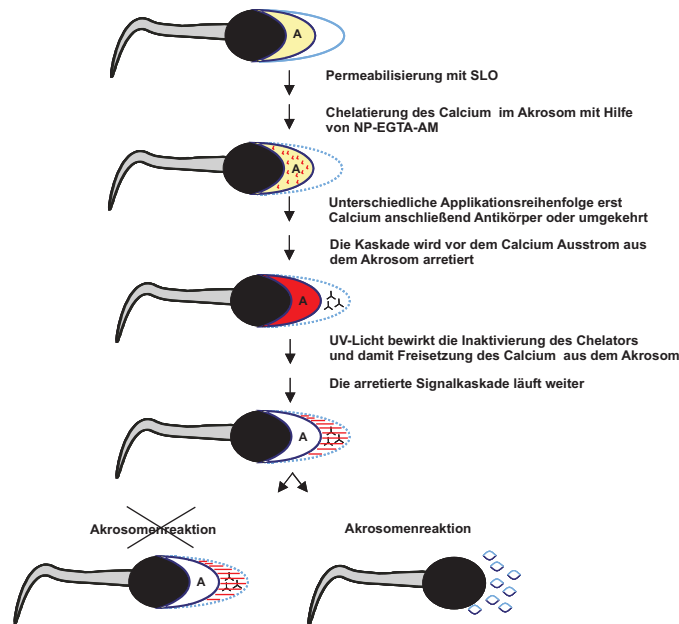


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der durch NP-EGTA-AM induzierten und kontrollierten zweiphasigen Akrosomenreaktion.

Spermien werden nach der Permeabilisierung mit SLO zuerst mit dem Licht-sensitive und membranpermeablen Calcium-Chelator NP-EGTA-AM inkubiert, wodurch das akrosomale Calcium komplexiert wird. Nach Zugabe von extrazellulärem Calcium werden anschließend die ersten Prozesse der Vesikelfusion wie das Anheften und Reifen des Vesikels ausgelöst, ohne dass es zum Ausstrom von Calcium aus dem Akrosom kommen kann. Durch eine anschließende Belichtung mit UV-Licht wird der Chelator zerstört, das akrosomale Calcium freigesetzt und somit die letzten Prozesse der Exocytose induziert. Die Zuordnung an welchem der beiden Teilprozesse ein Protein funktionell beteiligt ist, wird dadurch bestimmt, ob trotz der Inkubation mit Antikörpern nach dem Ausstrom des Calciums aus dem Akrosom noch eine Akrosomenreaktion registriert werden kann.

die Untersuchungen wurden isolierte Mausspermien kapazitiert, und die Plasmamembran gezielt durch eine Behandlung mit Streptolysin O permeabilisiert. Nach

der Permeabilisierung wurden die Spermien im Dunkeln für 20 min bei 37 °C mit 10 μ M NP-EGTA-AM inkubiert. Um das zu untersuchende Protein zeitlich in die Signalkaskade einzuordnen, wurden die Spermien entweder vor oder nach der Zugabe des extrazellulären Calciums (5 mM) mit den zu analysierenden Antikörpern inkubiert (4 μ l) und für weitere 20 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Spermien weder mit Calcium noch mit einem Antikörper inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Spermien, die ausschließlich mit Calcium behandelt wurden. Nach der Behandlung der Spermien mit sowohl 5 mM Calcium, als auch mit dem Antikörper, wurden die Keimzellen zur Zerstörung des Calcium Chelators für 2 min mit UV-Licht belichtet. Nach einer erneuten Inkubation für 20 min bei 37 °C wurden die Spermien gewaschen, fixiert, mit Coomassie Blau R250 gefärbt, auf Objektträgern getrocknet, eingedeckelt und der akrosomale Status bei ca. 100 bis 200 Spermien pro Ansatz überprüft (siehe 4.7.1, S. 65).

5 Ergebnisse

5.1 Analysen zur funktionellen Rolle von MUPP1 in Spermien

5.1.1 MUPP1 ist im Bereich des Akrosoms von Spermien lokalisiert

Unsere Ergebnisse bezüglich der Lokalisation von MUPP1 in Spermien haben gezeigt, dass das Adapterprotein in allen bislang untersuchten Säugerspezies lediglich im Akrosom bzw. in humanen Spermien und Bullenspermien auch im Äquatorialsegment zu finden ist (Heydecke et al., 2006). Um diesen Befund zu verifizieren, wurden zum einen Vergleichsfärbungen mit dem akrosomalen Marker Peanut Agglutinin (PNA) (Avilés et al., 1997) durchgeführt; zum anderen wurde überprüft, ob nach einer *in vitro* Induktion der akrosomalen Exocytose ein Verlust des Adapterproteins zu registrieren war.

Abbildungen 5.1A und B zeigen die Markierung von MUPP1 bzw. PNA in epididymalen kapazitierten Mausspermien. Es wird deutlich, dass der verwendete anti-MUPP1-Antikörper, der gegen die PDZ-Domäne 10 von MUPP1 gerichtet ist (Hamazaki et al., 2002), in Mausspermien lediglich im Kopfbereich einen schmalen Bereich erkennt, während im Flagellum keine Antikörperbindung auszumachen ist. Die Markierung grenzt direkt an den Zellkern (s. Abb. 5.1A, Kernfärbung mit Propidiumjodid, rot) und weist die für das Akrosom von Mausspermien typische Sichelform auf (Yanagimachi, 1994). Vergleichsfärbungen, die mit dem Akrosomenmarker PNA durchgeführt wurden (Avilés et al., 1997), ergaben, dass die Markierung des FITC-konjugierten Lektins die gleiche auffällige konvexe Form aufwies wie die Immunfärbung mit dem anti-MUPP1-Antikörper (s. Abb. 5.1B). MUPP1

ist somit offenbar lediglich in der vesikulären akrosomalen Kappe des Spermienkopfes lokalisiert (Heydecke et al., 2006).

Während der Akrosomenreaktion kommt es zur Bildung multipler Fusionsstellen zwischen äußerer akrosomaler Membran und der Plasmamembran, wodurch eine Vielzahl von kleinen Pseudovesikeln entstehen, durch die sicher gestellt wird, dass der gesamte akrosomale Inhalt in das umgebende Milieu des Spermiums abgegeben wird (Breitbart, 2002b). Der Verlust eines cytoplasmatischen oder akrosomalen Proteins nach einer *in vitro* Induktion der akrosomalen Sekretion kann somit als ein Indiz dafür gewertet werden, dass dieses Protein in der akrosomalen Kopfre-gion der Spermien lokalisiert ist (Blottner et al 1998).

Um dies für das MUPP1-Protein zu überprüfen, wurden kapazitierte Mausspermien zur Induktion der Akrosomenreaktion mit dem Calciumionophor A23187 inkubiert. A23187 ist eine Substanz aus *Streptomyces chartreusensis*, die sich mit ihrer hydrophoben Domäne als Komplex mit einem bivalenten Metallkation (bevorzugt Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}) in die Plasmamembran einlagert und so eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt und damit die Akrosomenreaktion auslöst (Christensen 1996).

Zur Klärung der Frage, ob MUPP1 im Bereich des Akrosoms von Säugerspermien lokalisiert ist, wurden kapazitierte Mausspermien mit A23187 behandelt, fixiert und entweder mit dem anti-MUPP1-Antikörper (s. Abb. 5.1A) oder ,als Kontrolle, mit dem FITC-konjugierten PNA (s. Abb. 5.1A) inkubiert. Anschließend wurde am Mikroskop überprüft wie viele der Spermien in den Präparaten eine akrosomale Sichelfärbung aufwiesen. Abbildung 5.1B macht deutlich, dass in dem Kontrollan-satz, in dem die Spermien mit dem Lektin PNA inkubiert wurden, keine akroso-male Markierung mehr zu registrieren ist. Eine Quantifizierung ergab, dass von den $74,8\% \pm 10,3$ der Spermien, die vor dem Auslösen der Akrosomenreaktion mit dem Calciumionophor noch ein intaktes Akrosom besaßen, nur noch $25,9\% \pm 11,7$ nach Behandlung mit A23187 ein Akrosom aufwiesen (s. Abb. 5.1E, $p < 0,01$). Ein ähnlicher Befund konnte auch für die MUPP1-Markierung registriert werden: Ohne Induktion der Akrosomenreaktion war im Falle des anti-MUPP1-Antikörpers bei $60,84\% \pm 13,69$ der Spermien die akrosomale Sichel markiert. Nach der Behand-lung mit A23187 konnte nur noch bei $13,74\% \pm 6,17$ der Spermien ein intaktes Akrosom nachgewiesen werden (s. Abb. 5.1E, $p < 0,05$) (Heydecke et al., 2006).

Dieser Befund zeigt, dass MUPP1 durch den Prozess der Akrosomenreaktion freigesetzt wird und im akrosomalen Vesikel, oder im umgebenden Cytosol, lokalisiert ist.

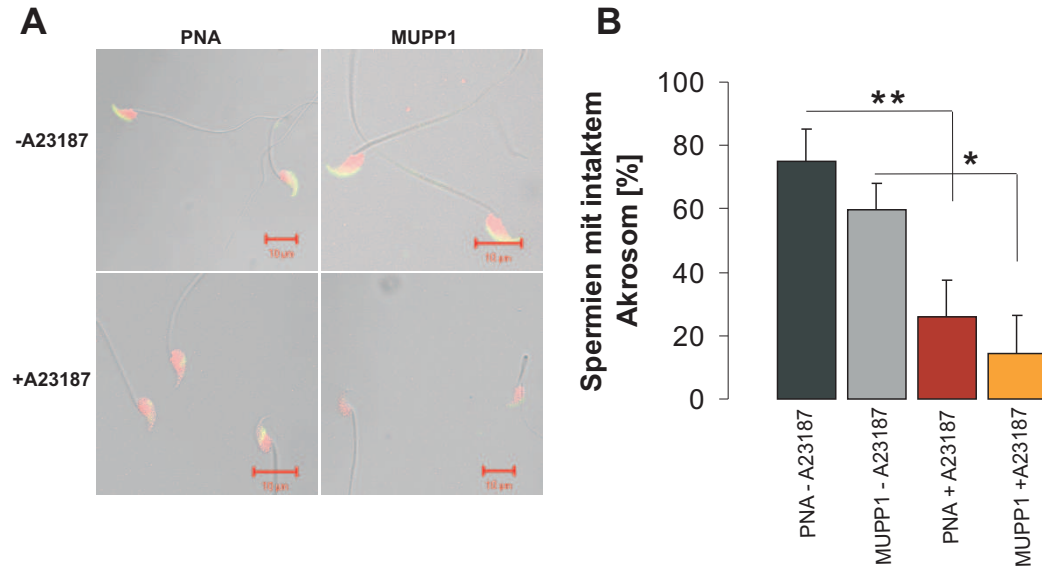


Abbildung 5.1: MUPP1 ist im Bereich des Akrosoms von Spermien lokalisiert. Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von MUPP1 in Spermien wurden immunocytochemische Färbungen mit einem anti-MUPP1-Antikörper **[A]** bzw. mit dem FITC-konjugierten akrosomalen Marker PNA **[B]** durchgeführt. Zur Detektion des anti-MUPP1-Antikörpers wurde ein ebenfalls mit FITC-konjugierter Sekundärantikörper (anti-Kaninchen IgG) verwendet (**A** MUPP1; grün). Ein Vergleich mit der PNA-Färbung macht deutlich, dass die mit dem anti-MUPP1-Antikörper durchgeführte Immunfärbung **[A]** zur gleichen sichelförmigen Markierung der Kopfkapselregion führt wie die Inkubation der Spermien mit dem FITC-konjugierten akrosomalen Marker PNA **[B]**. Eine Immunreaktivität des anti-MUPP1 IgGs im Flagellum ist dagegen nicht zu erkennen. Zur Verifizierung der beobachteten akrosomalen Lokalisation von MUPP1 wurden Mause spermien mit dem Calciumionophor A23187 zur Induktion der Akrosomenreaktion inkubiert, fixiert und erneut mit dem FITC-markiertem Lektin bzw. dem anti-MUPP1-Antikörper inkubiert **[C und D]**; anschließend wurde quantifiziert, wieviele der Keimzellen noch ein intaktes Akrosom besaßen bzw. wieviele Zellen es aufgrund einer Akrosomenreaktion verloren hatten. Durch die Induktion der Akrosomenreaktion war sowohl für MUPP1 (14 %; $p < 0,05$) als auch für PNA (26 %; $p < 0,01$) ein signifikanter Verlust der Markierung zu registrieren.

5.1.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von MUPP1

In immuncytochemischen Nachweisverfahren wurde beobachtet, dass das Adapterprotein MUPP1 vorwiegend im Bereich des Akrosoms von Säugerspermien konzentriert ist (s. Abb. 5.1A) (Heydecke et al., 2006). Da man mit Hilfe der exakten Bestimmung der subzellulären Lokalisation des MUPP1 Ankerproteins Rückschlüsse auf dessen zelluläre Funktion in männlichen Keimzellen gezogen werden können, wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. G. Aumüller und PD Dr. B. Wilhelm (Philipps Universität Marburg, Institut für Anatomie und Zellbiologie) elektronenmikroskopische Untersuchungen an Ultradünnschnitten von Maushoden durchgeführt. Abbildung 5.2 zeigt repräsentative Aufnahmen des Nachweises von MUPP1 an Semidünnschnitten längsgeschnittener reifer Spermatiden der Maus. In den Übersichtsaufnahmen sind jeweils der Kopfbereich mit dem Zellkern (s. Abb. 5.2, nu) und das akrosomale Vesikel (ac) zu erkennen. Der elektronendichte Bereich repräsentiert den Zellkern (nu) der Spermien, die weniger elektronendichten helleren Regionen begrenzen das Akrosom (ac). Die detaillierte Analyse der präzipitierten Goldpartikel (s. Abb. 5.2; Pfeile, Pfeilspitzen), die die subzelluläre Lokalisation von MUPP1 reflektieren, zeigt eine auffällige Konzentrierung im Bereich des Akrosoms (s. Abb. 5.2, B und E), die auf Gewebeschnitten, die lediglich mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden, nicht auszumachen ist (s. Abb. 5.2, A und D). In den vergrößerten Ausschnitten der Übersichtsaufnahmen ist auffällig, dass die punktförmigen Markierungen perlschnurartig an der Grenze zwischen Akrosom und Cytoplasma aufgereiht zu sein scheinen (s. Abb. 5.2, E und F, Pfeile) (Ackermann et al., 2008). Auf ein Nachfixieren der Präparate zur besseren Darstellung der Membranstrukturen wurde verzichtet, um eine Inhibierung der Antikörperbindung zu verhindern (Neesen et al 2002). Deshalb kann nicht eindeutig gesagt werden, ob die identifizierten Goldpartikel sich auf der akrosomalen oder der cytosolischen Seite der äußeren akrosomalen Membran befinden.

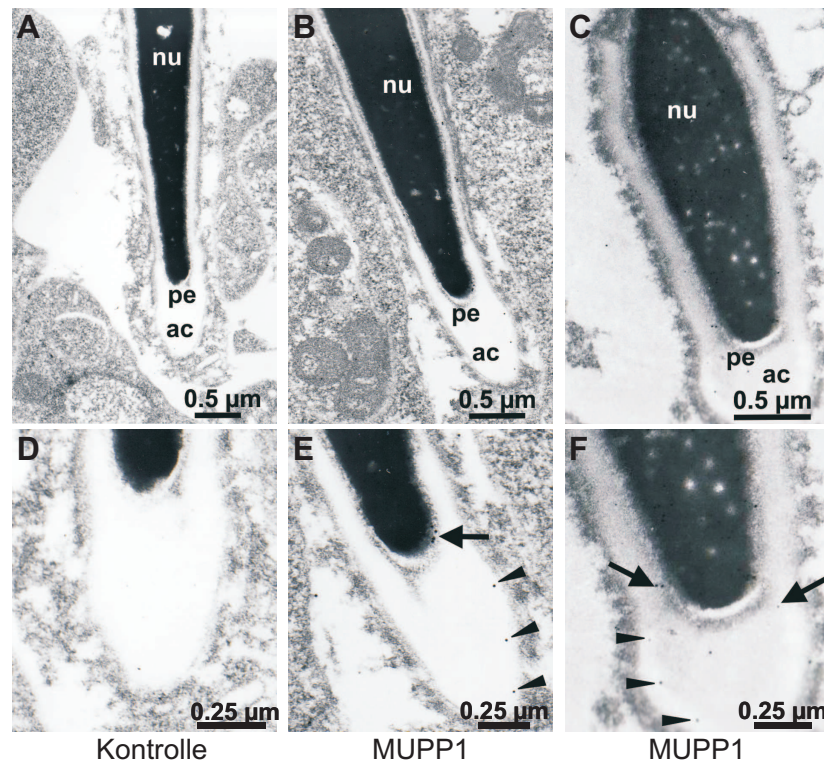


Abbildung 5.2: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von MUPP1 in Hodengewebe der Maus.

Um die subzelluläre Lokalisation des PDZ-Domänen Proteins MUPP1 im Bereich des Akrosoms exakt bestimmen zu können, wurden elektronenmikroskopische Färbungen an Hodengewebe der Maus durchgeführt. Dazu wurde ein Primärantikörper gegen die PDZ-Domäne 10 des MUPP1 verwendet; der Nachweis gebundener anti-MUPP1-Antikörper erfolgte mit Hilfe eines Goldpartikel-konjugierten Sekundärantikörpers (Ziege anti-Kaninchen IgG).

Deutlich zu erkennen sind die jeweils längs angeschnittenen Spermatiden mit dem elektronendichten Zellkern (nu) und ihm aufliegend, das Akrosom (ac); dazwischen ist die perinukleare Substanz mit dem Perforatorium (pe) zu erkennen. Es fällt auf, dass die Goldpartikel im Bereich der Plasmamembran bzw. der äußeren akrosomalen Membran (Pfeile) und im Bereich des Perforatoriums in der Region der inneren akrosomalen Membran (Pfeilspitzen) jeweils wie auf einer Perlenschnur aufgereiht angeordnet sind.

[A] und [D] zeigen eine Aufnahme eines Semidünnschnittes, der lediglich mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurde. In [B],[C],[E] und [F] wurden die Schnitte mit dem anti-MUPP1-IgG behandelt. In [A],[B] und [C] sind jeweils der Kopfbereich eines reifen elongierten Spermiums dargestellt; [D],[E] und [F] stellen jeweils Ausschnittsvergrößerungen des Kopfbereichs aus den direkt darüber liegenden Aufnahmen [A],[B] und [C] dar.

5.1.3 Das Adapterprotein MUPP1 ist funktionell an der akrosomalen Exocytose beteiligt

Aufgrund der beobachteten subzellulären Lokalisation von MUPP1 im Bereich des Akrosoms (siehe 5.1.2) und seinen 13 Protein-Protein Interaktionsdomänen ist

dieses *scaffolding*-Protein ein vielversprechender Kandidat, um als eine Art molekulares Rückgrad Signalmoleküle für den Prozess der akrosomalen Exocytose in einem funktionellen Signalkomplex räumlich zu organisieren.

Um diese Hypothese zu prüfen, war es notwendig, das endogene MUPP1 Protein in kapazitierten Spermien selektiv zu blockieren und anschließend den Effekt einer solchen Inhibition auf die Effizienz der akrosomalen Exocytose zu untersuchen. Da reife Spermien genetischen Methoden, wie z. B. der *small interfering* RNA Technik (siRNA), für einen gezielten knock-down von Proteinen (Elbashir et al., 2001) auf Grund ihrer fehlenden Proteinbiosynthese (Sullivan et al., 2005) nicht zugänglich sind, wurde ein Ansatz gewählt, bei dem das MUPP1-Protein durch die Bindung eines Antikörpers sterisch blockiert wird (Tomes, 2007). Es wurden Mausspermien durch die Inkubation mit Streptolysin O (SLO), einem Bakterientoxin, das sich an die Plasmamembran der Spermien anlagert und darin Poren ausbildet (Bhakti et al., 1993), permeabilisiert und anschließend mit verschiedenen Antikörpern prä-inkubiert (s. Abb.4.3). Dazu wurden zwei anti-MUPP1-Antikörper, die verschiedene Epitope dieses Gerüstproteins detektieren, eingesetzt: Der in unserem Labor hergestellte Antikörper (anti-MUPP1_p) ist gegen drei kurze Peptidmotive (aa 226 - 240; aa 1437 - 1452; aa 1788 - 1803), die jeweils zwischen einzelnen PDZ-Domänen (PDZ 1 -2; PDZ 8 - 9; PDZ 11 - 12) liegen, gerichtet; der von Prof. Dr. R. T. Javier (Department of Molecular Virology and Microbiology, Baylor College of Medicine, Houston, USA) zur Verfügung gestellte Antikörper erkennt lediglich einen Bereich zwischen der PDZ Domänen 5 und 6 des MUPP1 (anti-MUPP1_{JV} (Lee et al., 2000)). Zusätzlich wurde ein Antikörper gegen die kleine GTPase Rab3A für die Untersuchungen verwendet. Für diese GTPase konnte in humanen Spermien bereits nachgewiesen werden, dass die Inkubation von permeabilisierten Spermien mit einem anti-Rab3A-Antikörper zu einer Inhibition der Akrosomenreaktion führt (Blas et al., 2005). Um zusätzlich sicherzustellen, dass eine Antikörperbeladung nicht per se zu einer Reduzierung der Akrosomenreaktionsrate führt, wurde in einer Negativkontrolle geprüft, ob anti-Kaninchen IgGs einen Effekt auf die Akrosomenreaktionsrate haben.

Zur Verifizierung der Antikörpereffekte, wurden die eingesetzten Antikörper zunächst mit Hilfe ihrer immunogenen Peptide neutralisiert und anschließend mit den isolierten Spermien inkubiert. Um allerdings sicher zu stellen, dass diese Peptid-

Behandlung auch tatsächlich zu einer Neutralisation der Antikörper führt, wurden sowohl Westernblot-Analysen als auch immuncytochemische Studien mit den vorinkubierten anti-Rab3A- bzw. dem anti-MUPP1_{JV}-Antikörper (Lee et al., 2000) durchgeführt. Für den verwendeten anti-Rab3A-Antikörper konnte ein entsprechendes antigenes Peptid käuflich erworben werden. Für den von Herrn Prof. R. T. Javier zur Verfügung gestellten anti-MUPP1-Antikörper (Lee et al., 2000) wurde das entsprechende Antigen in Form eines GST-Fusionsproteins (pGEX2T1-MUPP5/6) exprimiert und aufgereinigt (s. Methoden).

Abbildung 5.3 zeigt, dass der anti-MUPP1-Antikörper eine Bande mit der für MUPP1 beschriebenen molekularen Größe von ca. 220 kDa sowohl in der Cortexprobe als auch in der Spermienprobe erkennt; zusätzlich wurde in der Hirnprobe eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 200 kDa detektiert, die offenbar ein Proteolyseprodukt von MUPP1 darstellt (Ackermann et al., 2008) (s. Abb. 5.3A). Der anti-Rab3A-Antikörper erkennt im Cortexgewebe eine Bande mit der molekularen Größe von 25 kDa und ein kleineres, in der Literatur beschriebenes Proteolyseprodukt, das in der Spermienprobe ausschließlich erkannt wird (s. Abb. 5.3A). Durch eine Vorinkubation der Antikörper mit ihren korrespondierenden Peptiden wurde die Antikörperbindung unterbunden; lediglich in der Cortexprobe war mit dem neutralisierten anti-MUPP1_{JV} Antikörper (Lee et al., 2000) eine schwache Immunreaktivität der MUPP1-Bande zu detektieren (s. Abb. 5.3A; anti-Rab3A+bp, anti-MUPP1+fp). In immuncytochemischen Färbungen an Spermien der Maus zeigten beide Antikörper, sowohl anti-MUPP1_{JV} als auch anti-Rab3A, eine spezifische akrosomale Markierung, die auch hier durch die Vorinkubation der Antikörper mit den entsprechenden Blockierungspeptiden aufgehoben werden konnte (s. Abb. 5.3B; anti-Rab3A + bp, anti-MUPP1 + fp). Diese Befunde zeigen, dass die verwendeten Antikörper ihr Epitop binden und für die funktionellen Untersuchungen an permeabilisierten Mausspermien eingesetzt werden konnten. Im Einzelnen wurden dazu isolierte und kapazitierte Mausspermien mit verschiedenen Antikörpern inkubiert und anschließend in einem Medium, dass mit 5 mM CaCl₂ supplementiert wurde, überführt. Das Calcium, das aufgrund des herrschenden Konzentrationsgradienten zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Calcium durch die durch SLO gebildeten Poren ins Cytoplasma der Spermien strömte, löste dann die Calcium-vermittelte akrosomale Exocytose aus (Tomes, 2007). An-

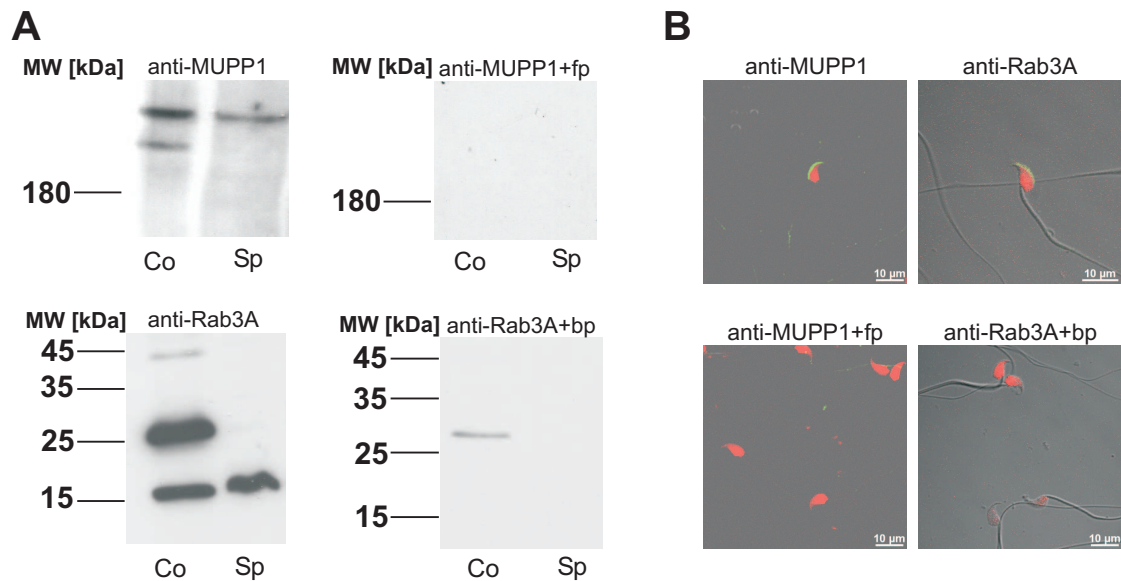


Abbildung 5.3: Spezifitätsnachweis der verwendeten anti-MUPP1- bzw. anti-Rab3A-Antikörper.

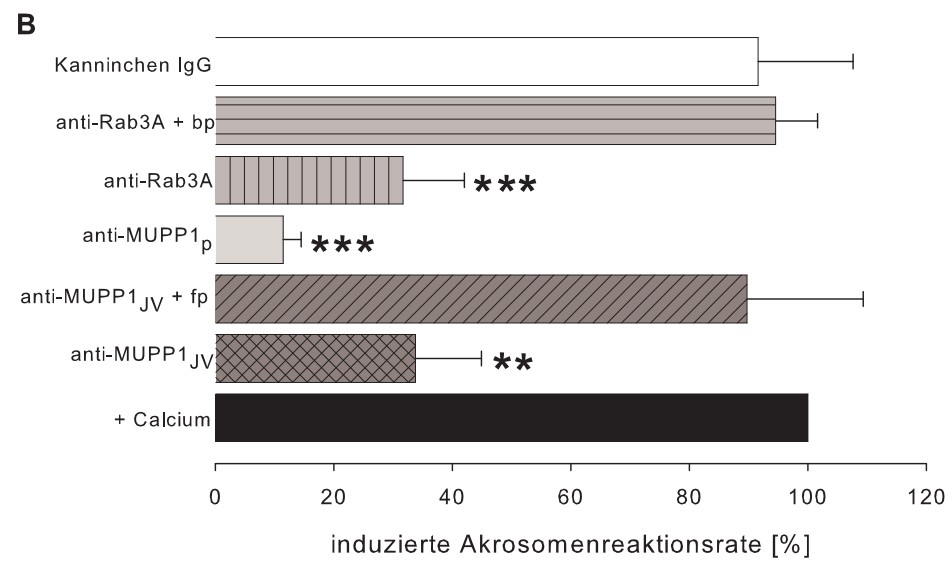
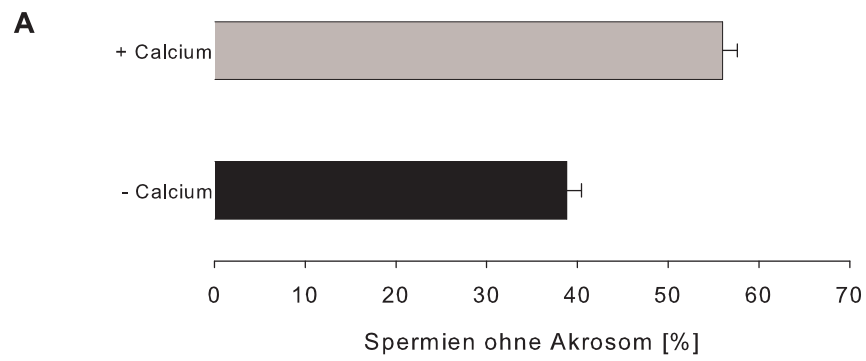
Zur Überprüfung der Spezifität der als selektive Blocker der Akrosomenreaktion eingesetzten Antikörpern wurden diese zuerst mit ihren korrespondierenden antigenen Peptiden neutralisiert. Um die Effizienz der Neutralisation zu überprüfen, wurden Westernblot-Analysen und immunocytochemische Färbungen durchgeführt.

[A] Westernblot-Analysen. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen einer Membranfraktion von Cortexgewebe und Spermien der Ratte über ein SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und anschließend mit einem anti-MUPP1-(1:5000) bzw. anti-Rab3A-(1:500) Antikörper inkubiert. In einem parallelen Ansatz wurden die Antikörper vor der Inkubation der Membranen zusammen mit ihren korrespondierenden Peptiden neutralisiert. Ohne eine Vorinkubation mit den Peptid erkennen die Antikörper sowohl im Cortex als auch in Spermien Banden der korrespondierenden Größen (anti-MUPP1, anti-Rab3A), wobei auch kleinere Proteolyseprodukte erkannt werden. Durch eine Vorinkubation der Antikörper mit den Blockierungspeptiden kann die Reaktivität der Antikörper fast vollständig aufgehoben werden; lediglich für den anti-Rab3A-Antikörper ist in der Cortexprobe noch eine schwache Bande zu detektieren (anti-MUPP1 + fp, anti-Rab3A + bp).

[B] Immunocytochemische Färbungen an Mausspermien. Sowohl der anti-MUPP1-Antikörper als auch der anti-Rab3A-Antikörper zeigen eine akrosomale Markierung in Mausspermien (anti-MUPP1, anti-Rab3A). Diese Immunfärbung geht durch die Vorinkubation der Antikörper mit den entsprechenden Peptiden vollständig verloren (anti-MUPP1 + fp, anti-Rab3A + bp).

schließlich wurden die Spermien fixiert und dann daraufhin analysiert, wieviele Spermien ihr Akrosom verloren hatten (Ackermann et al., 2008).

Bei einer spontanen Akrosomenreaktionsrate von 38,6 % ($\pm 1,6$) konnte durch die Zugabe von extrazellulärem Calcium eine Induktion der akrosomalen Exocytose



von 17.0 % ($\pm 1,7$) in der Positivkontrolle (ohne Antikörper) erreicht werden (s. Abb. 5.4A). Diese Induktion wurde für die Auswertung der übrigen Ansätze als 100 % gesetzt, so dass sich alle weiteren Prozentangaben auf diese 100 % induzierte Akrosomenreaktionsrate beziehen. Eine Inkubation mit Kaninchen IgG führte zu keiner signifikanten Beeinflussung der Akrosomenreaktion ($115,1 \% \pm 28,6$). Die Zugabe eines anti-Rab3A-Antikörpers bewirkte dagegen eine signifikante Inhibition der Akrosomenreaktionsrate: Die induzierte Akrosomenreaktionsrate lag im Vergleich zur Positivkontrolle (100 %) bei nur 33,7 % ($\pm 11,1$; $p < 0,001$) (s. Abb. 5.4B; anti-Rab3A). Eine vergleichbare Inhibition der Akrosomenreaktionsrate wurde auch durch die Inkubation der Mausspermien mit dem anti-MUPP1_{JV}-Antikörper (Lee et al., 2000) erreicht (s. Abb. 5.4B; anti-MUPP1): Es war noch eine Akrosomenreaktionsrate von 31,7 % ($\pm 10,4$), in den so behandelten Spermien, im Vergleich zur Positivkontrolle zu beobachten ($p < 0,01$).

Bemerkenswerterweise konnte dieser blockierende Effekt des anti-MUPP1_{JV}-Antikörpers durch den in unserem Labor hergestellten Antikörper (anti-MUPP1_P) noch verstärkt werden: Hier lag die induzierte Akrosomenreaktionsrate lediglich bei

Abbildung 5.4: Untersuchungen zur funktionellen Rolle von MUPP1 während der akrosomalen Exocytose.

Isolierte Spermien der Maus wurden mit dem bakteriellen Toxin Streptolysin O permeabilisiert und anschließend entweder mit verschiedenen anti-MUPP1- oder einem anti-Rab3A-Antikörpern inkubiert. Um die Spezifität der durch die Antikörper hervorgerufenen Effekte zu überprüfen, wurden die Antikörper (anti-MUPP1_{JV}; anti-Rab3A) in einem parallelen Ansatz jeweils mit den korrespondierenden Peptiden (+fp; +bp) vorinkubiert. Als zusätzliche Kontrolle wurden die Spermien mit einem anti-Kaninchen IgG inkubiert. **[A]** Die Akrosomenreaktion wurde durch die Erhöhung des extrazellulären Calciums auf 5 mM induziert, wodurch die Akrosomenreaktionsrate von $38,8 \% \pm 1,6$ in nicht stimulierten Spermien auf $55,9 \% \pm 1,6$ erhöht wurde. Die Induktionsrate von $17,1 \% \pm 1,5$ wurde für die weitere Auswertung als 100 % gesetzt und zur Berechnung des prozentualen Anteils Akrosom-reagierter Spermien in den übrigen Ansätzen verwendet. **[B]** Die statistische Auswertung (studentischer t-Test) zeigt, dass die Zugabe sowohl des anti-Rab3A-Antikörpers ($p < 0,001$) als auch der beiden anti-MUPP1-Antikörper (MUPP1_{JV} $p < 0,01$; MUPP1_P $p < 0,001$) die Induktion der Akrosomenreaktion signifikant inhibiert. Die Inkubation der Spermien mit einem anti-Kaninchen IgG hat dagegen keinen Einfluss auf die durch Calcium-induzierte Akrosomenreaktion. Durch die Vorinkubation der Antikörper mit den korrespondierenden Peptiden (+fp / +bp) konnte der inhibitorische Effekt der Antikörper fast vollständig aufgehoben werden.

Die Daten sind Mittelwerte aus 7 bis 18 Einzelexperimenten, wobei die verwendeten Spermien der einzelnen Experimente jeweils von unterschiedlichen Mäusen stammten.

11,5% ($\pm 3,0$; $p < 0,001$).

Um die Spezifität der beobachteten Inhibition der Akrosomenreaktion durch die Antikörper gegen Rab3A und MUPP1_{JV} zu überprüfen, wurden die Spermien in einem parallelen Ansatz mit Antikörpern inkubiert, die zuvor mit ihren entsprechenden antigenen Peptiden neutralisiert wurden. In beiden Fällen, sowohl für MUPP1_{JV} (94,5 % $\pm 7,1$) als auch für Rab3A (89,7 % $\pm 19,6$), konnte die durch den Antikörper hervorgerufene Inhibition der Akrosomenreaktion dadurch aufgehoben werden (s. Abb. 5.4B; MUPP1 + fp, Rab3A + bp) (Ackermann et al., 2008).

5.1.4 MUPP1 ist funktionell an den einleitenden Prozessen der Akrosomenreaktion beteiligt

Unsere bisherigen Resultate hinsichtlich der inhibitorischen Wirkung verschiedener anti-MUPP1-Antikörper auf die Akrosomenreaktion (5.1.3) deuten darauf hin, dass MUPP1 an dem Prozess der Calcium-regulierten akrosomalen Exocytose in Spermien funktionell beteiligt ist. Diese spezielle Form der Exocytose in Spermien zeichnet sich durch einen mehrphasigen Prozess aus: Die Stimulierung mit ZP3 bewirkt einen kurzen Einstrom von extrazellulärem Calcium ins Cytosol der Zelle, der die frühe initiale Phase der Exocytose induziert (Branham et al., 2006). Das eingeströmte cytosolische Calcium leitet dann die zweite Phase der Akrosomenreaktion ein, während der es zu einem massiven Ausstrom von Calcium aus dem Akrosom kommt, das dann über eine Destabilisierung des SNARE-Synaptobrevin Komplexes die Verschmelzung der äußeren akrosomalen Membran des Akrosoms mit der Plasmamembran bewirkt (De Blas et al., 2005) (s. Abb. 2.3).

Dieser mehrstufige Verlauf der Exocytose in Spermien wirft die Frage auf, ob MUPP1 an den vorbereitenden Prozessen des Vesikels für die Fusion und/oder dem finalen SNARE-kontrollierten Verschmelzungsprozess beteiligt ist. Daher wurden die oben dargestellten funktionellen Stimulierungsexperimente (5.1.3) mit einem UV-sensitiven Calcium-Chelator kombiniert. Diese Kombination erlaubt es, durch eine gezielte Zugabe der inhibitorisch-wirkenden anti-MUPP1-Antikörper zu bestimmen, an welcher der beiden zeitlich aufeinander folgenden Prozesse der Exocytose dieses Protein beteiligt ist (s. Abb. 5.5) (Ackermann et al., 2008).

Im Einzelnen wurde dabei wie folgt vorgegangen: Kapazitierte Spermien wurden nach der Permeabilisierung mit dem UV-sensitiven Calciumchelator NP-EGTA-AM inkubiert, der daraufhin über die Plasmamembran sowie die akrosomale Membran in das Akrosom gelangte und das dort vorhandene Calcium komplexierte. Dadurch ist man in der Lage, durch Zugabe von Calcium (5 mM) die Akrosomenreaktion an einem definierten Punkt, dem Calciumausstrom aus dem Akrosom, zu arretieren. Durch eine 2 minütige Bestrahlung mit UV-Licht kann der Chelator anschließend zerstört, das Calcium aus dem Akrosom freigesetzt und damit die finalen Prozesse der Membranfusion eingeleitet werden.

Durch eine gezielte Zugabe der inhibitorisch-wirkenden anti-MUPP1-Antikörper vor oder nach der Erhöhung des extrazellulären Calciums ist bei diesem experimentellen Ansatz mit folgenden Befunden zu rechnen (s. auch (Ackermann et al., 2008)).

Inkubiert man die permeabilisierten Spermien zunächst mit den inhibitorisch wirkenden Antikörpern und erst dann mit extrazellulärem Calcium, wird die Akrosomenreaktion in jedem Fall inhibiert, unabhängig davon, an welchem Teilprozess das zu analysierende Protein funktionell beteiligt ist (s. Abb. 5.5; [Ch/Ak/Ca²⁺/hv]). Findet die Antikörperzugabe allerdings erst nach der Zugabe des extrazellulären Calciums statt, sind prinzipiell zwei verschiedene Resultate zu erwarten:

1. Eine Akrosomenreaktionsrate vergleichbar der Positivkontrolle:

In diesem Fall würde der Antikörper zwar an sein Epitop binden, könnte aber die Reaktion nicht mehr inhibieren, weil diese bereits, induziert durch die vorherige Inkubation mit dem extrazellulärem Calcium, vollständig abgelaufen ist. Das Protein ist an den frühen Prozessen der Fusion vor dem zweiten Calciumausstrom aus dem Akrosom beteiligt (s. Abb. 5.5; [Ch/Ca²⁺/Ak/hv]).

2. Eine Inhibition der Akrosomenreaktionsrate:

Der Antikörper bindet sein Epitop, wodurch nach dem durch UV-Licht-induzierten Calciumausstrom aus dem Akrosom das Ablaufen der späten Prozesse der Sekretion verhindert wird. Das Protein ist also an Teilprozessen nach der Freisetzung von Calcium aus dem Akrosom beteiligt (s. Abb. 5.5; [Ch/Ca²⁺/Ak/hv]).

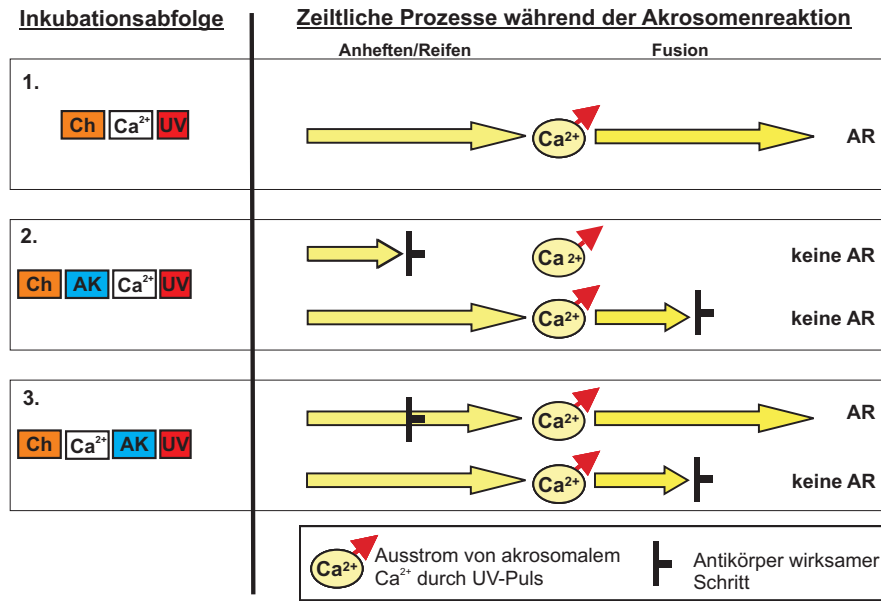


Abbildung 5.5: Experimenteller Aufbau der verwendeten Chelator-Strategie. Um die funktionelle Rolle von MUPP1 innerhalb der sequentiellen Signalabfolge während der Akrosomenreaktion einordnen zu können, wurde der funktionelle Ansatz an permeabilisierten Spermien mit einer Calcium-Chelator-Strategie kombiniert. [1.] Das akrosomale Calcium wird durch den membrangängigen Chelator NP-EGTA-AM komplexiert [Ch]. Durch die Gabe von extrazellulärem Calcium [Ca²⁺] wird anschließend die Signalkaskade gestartet, sie läuft bis zu dem Punkt, an dem der Ausstrom von akrosomalem Calcium die letzten Schritte der Fusion einleitet. Durch einen anschließenden UV-Puls [UV] wird das Calcium aus dem Akrosom freigesetzt und die Akrosomenreaktion läuft vollständig ab [AR]. [2.] Inkubiert man permeabilisierte Spermien zunächst mit dem Antikörper [AK] und dann mit Calcium [Ca²⁺], kann der Antikörper unabhängig davon, an welcher Stelle der Kaskade das Protein seine Funktion ausübt in jedem Fall seine inhibitorische Wirkung auf die Signalkaskade ausüben [keine AR]. [3.] Werden die Spermien allerdings zuerst mit Calcium [Ca²⁺] und dann mit dem Antikörper [AK] inkubiert, laufen die Teilschritte der Akrosomenreaktion ohne Beeinflussung durch den Antikörper bis zu dem Schritt ab, an dem akrosomales Calcium für die weitere Reaktion notwendig ist. Inkubiert man die Spermien dann mit dem Antikörper, kann dieser nur noch dann eine inhibitorische Wirkung ausüben, wenn das Protein an den späten Prozessen der Reaktion beteiligt ist.

Mit Hilfe dieses kombinierten experimentellen Ansatzes sollte analysiert werden, an welchen sequentiellen Teilschritten MUPP1 funktionelle beteiligt ist. Da vom t-SNARE Syntaxin 2 bekannt ist, dass es an der Calcium/Synaptobrevin-vermittelten finalen Ausbildung der Fusionspore beteiligt ist (zur Übersicht s. (Jahn et al., 2003)), wurde ein anti-Syntaxin 2-Antikörper eingesetzt, um sicherzustellen, dass dieser letzte Teilprozess durch den verwendeten experimentellen Ansatz tatsäch-

lich blockiert werden kann (Ackermann et al., 2008).

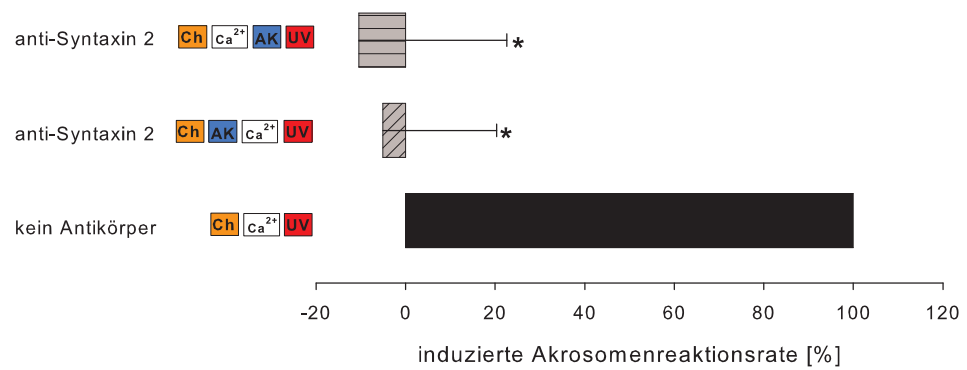
Die permeabilisierten und mit dem Chelator beladenen Spermien wurden, wie oben beschrieben, entweder zuerst mit den Antikörpern und anschließend mit extrazellulärem Calcium oder zuerst mit extrazellulärem Calcium und anschließend mit dem entsprechenden Antikörpern inkubiert (s. Abb. 5.5). Nach Ablauf der Inkubation erfolgte eine 2 minütige Belichtung mit UV-Licht (254 nm) und eine weitere 20 minütige Inkubation bei 37°C. Daraufhin wurden die Spermien fixiert, mit Coomassie Blau gefärbt und die Anzahl intakter Akrosomen bestimmt (s. Methoden). Bei einer registrierten spontanen Akrosomenreaktionsrate von 44,6 % ($\pm 2,0$) konnte durch die Freisetzung des komplexierten akrosomalen Calciums eine signifikante Induktion der Akrosomenreaktion von 10,2 % ($\pm 1,0$) erzielt werden. Sie wurde für die weitere Auswertung der übrigen Ansätze als 100 % festgesetzt.

Behandelte man die permeabilisierten Spermien vor der Inkubation mit Calcium mit einem Antikörper gegen das t-SNARE Protein Syntaxin 2, so kam es zu einer nahezu vollständigen Inhibition des induzierten Exocytoseprozesses im Vergleich zur Positivkontrolle ohne Antikörper ($-5,1 \% \pm 25,4$; $p < 0,05$) (s. Abb. 5.6A, anti-Syntaxin 2/Calcium); die umgekehrte Inkubationsabfolge führte ebenfalls zu einer vollständigen Inhibition der induzierten Akrosomenreaktion ($-10,4 \% \pm 33,0$, $p < 0,05$).

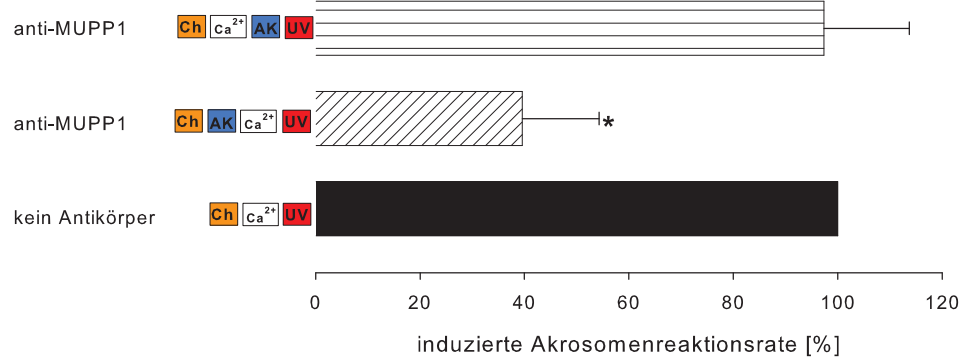
Die Inkubation der Spermien mit dem anti-MUPP1_{JV}-Antikörper hatte dagegen unterschiedliche Effekte auf die akrosomale Exocytoserate der Spermien: Die Inkubation von Mausspermien mit dem anti-MUPP1_{JV}-Antikörper vor der Gabe von extrazellulärem Calcium führte zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl an Spermien, die einen akrosomalen Sekretionsprozess durchliefen; Es wurde nur noch eine induzierte Akrosomenreaktionsrate von 39,5 % ($\pm 14,6$) im Vergleich zur Kontrolle ohne Antikörper (100 %) erreicht ($p < 0,05$) (s. Abb. 5.6; NP-EGTA/anti MUPP1/Calcium).

Wenn die Spermien erst nach der Inkubation mit extrazellulärem Calcium mit dem anti-MUPP1_{JV}-Antikörper inkubiert wurden, zeigte sich ein Unterschied zu dem Ansatz mit dem anti-Syntaxin 2-Antikörper: Der anti-MUPP1-Antikörper verlor seine inhibitorische Wirkung auf die Akrosomenreaktion der Spermien (s. Abb. 5.6; NP-EGTA/Calcium/anti-MUPP1): Die induzierte Akrosomenreaktionsrate betrug 97,3 % ($\pm 16,3$) (Ackermann et al., 2008).

A



B



5.1.5 MUPP1 ist mit *detergent-insoluble glycolipid-enriched membrane complexes* (DIGs) in Spermien der Ratte assoziiert

Die Beobachtung aus den elektronenmikroskopischen Studien bezüglich der spezifischen Lokalisation von MUPP1 in der akrosomalen Region reifer Spermien (s. Abb.??) (Heydecke et al., 2006) sowie die Hinweise, dass dieses PDZ-Protein funktionell an der akrosomalen Exocytose beteiligt ist (s. Abb. 5.4), führten zu der Frage, ob MUPP1 mit Hilfe seiner 13 PDZ-Domänen eine topologische Organisation von Signalmolekülen vornimmt, die an der Erkennung und Transduktion von Zona pellucida Komponenten beteiligt ist und/oder gezielt Moleküle bindet, die das Anlagern (*tethering*) und das anschließende festere Anheften (*docking*) des Akrosoms an die Plasmamembran kontrollieren. Da eine Vielzahl der Moleküle, die an der Calcium-induzierten Exocytose beteiligt sind, in anderen zellulären Systemen, wie Rezeptoren, Effektorenzyme, Ionenkanäle und einige SNARE-Proteine häufig in Detergenz-unlöslichen *lipid raft* Membranmikrodomänen konzentriert sind (Golub

Abbildung 5.6: MUPP1 ist funktionell an den einleitenden Prozessen der Akrosomenreaktion beteiligt.

Um die Frage zu beantworten, an welchen zeitlich aufeinander folgenden Prozessen während der Akrosomenreaktion MUPP1 bzw. Syntaxin 2 funktionell beteiligt sind, wurden permeabilisierte Spermien mit einem Calcium-Chelator (NP-EGTA-AM) beladen und anschließend in unterschiedlicher Reaktionsabfolge mit den Antikörpern und Calcium inkubiert. Nach der Inkubationsabfolge wurde der Chelator durch einen 2 minütigen UV-Puls zerstört und damit die letzten Prozesse der Membranfusion induziert. Bei einer spontanen Akrosomenreaktionsrate von 44,6 % ($\pm 2,0$) konnte durch die Freisetzung des akrosomalen Calciums ohne Antikörperinkubation eine Induktion der Akrosomenreaktionsrate von 10,2 % ($\pm 1,0$) erreicht werden, die für die Auswertung der übrigen Ansätze als 100 % gesetzt wurde [A]. Die statistische Auswertung (studentischer T-Test) zeigt, dass der anti-Syntaxin 2-Antikörper die Akrosomenreaktion inhibiert unabhängig davon ob die Spermien vor der Gabe von Calcium ($-5,1 \% \pm 25,4$, $p < 0,05$) oder anschließend mit dem Antikörper ($-10,4 \% \pm 33,0$, $p < 0,05$) inkubiert wurden. [B] Auch der anti-MUPP1_{JV}-Antikörper inhibierte die Akrosomenreaktion, wenn er vor der Gabe von extrazellulärem Calcium zu den Spermien gegeben wurde ($39,5 \% \pm 14,6$, $p < 0,05$). Die umgekehrte Inkubationsabfolge führte allerdings dazu, dass der anti-MUPP1_{JV}-Antikörper diesen inhibitorischen Effekt verlor. 97,3 % ($\pm 16,3$) der Spermien durchliefen eine Akrosomenreaktion wenn sie nach der Gabe von Calcium mit dem anti-MUPP1-Antikörper inkubiert wurden. Die Daten sind Mittelwerte aus 10 bis 11 Einzelerperimenten, wobei die Spermien der einzelnen Experimente jeweils von unterschiedlichen Mäusen stammen.

et al., 2004), wurde im Folgenden geprüft, ob das Gerüstprotein MUPP1 ebenfalls in entsprechenden Membranmikrodomänen konzentriert ist. *Lipid rafts* sind Mikrodomänen innerhalb biologischer Membranen, die sich durch ihren hohen Gehalt an Glykosphingolipiden und Cholesterol auszeichnen (Mishra and Joshi, 2007); sie können deshalb entweder auf Grund ihre Unlöslichkeit in dem Detergenz Triton X-100 oder wegen ihrer geringen spezifischen Dichte relativ leicht isoliert werden (Ostrom and Liu, 2007). In Westernblot-Analysen kann anschließend überprüft werden, ob in den gewonnenen *detergent-insoluble glycolipid-enriched membrane complexes* (DIGs) die zu analysierenden Proteinen nachzuweisen sind.

Zur Anreicherung von DIGs aus Rattenspermien wurden zunächst Mikrosomenpräparationen aus epididymalen Spermatozoen hergestellt (s. Abb. 5.7; P_{50}), die dann in einer mit 1,5 % Triton X-100 supplementieren PBS-Pufferlösung für 30 min bei 4°C solubilisiert wurden. Durch eine anschließende Zentrifugation wurden die Detergenz-löslichen Komponenten (S_{TX}) von den DIGs (P_{TX}) separiert und mit Hilfe der Westernblot-Technik auf die Verteilung verschiedener Proteine hin analysiert.

Um zu prüfen, ob die beschriebene Methode zur Anreicherung von DIGs aus Mausepermien (Travis et al., 2001) auf Spermien der Ratte übertragen werden kann, wurde zunächst überprüft, ob Caveolin 1, ein Markerprotein für DIGs bzw. Caveolae (Parton and Simons, 2007), in der DIG Fraktion aus Rattenspermien nachzuweisen ist. Abbildung 5.7 zeigt, dass mit einem anti-Caveolin 1-Antikörper die stärkste Reaktivität in der Fraktion zu registrieren ist, in der die DIGs angereichert sind (s. Abb. 5.7A; Caveolin P_{TX}). Das cytosolische Adapterprotein MUPP1 zeigte interessanterweise ein ähnliches Verteilungsmuster wie Caveolin 1: Neben dem Auftreten in der Mikrosomenfraktion (P_{50}), in welcher es nur schwach nachzuweisen war, war es in der DIG-Fraktion (P_{TX}) stark angereichert. In der S_{TX} Fraktion war dagegen keine Markierung zu detektieren.

Spermien machen während der Befruchtung einen Reifungsprozess, die sogenannte Kapazitation durch, während der es u. a. zu einer Reduzierung des Cholesterolgehalts in der Plasmamembran (Brewis et al., 2005) und damit einhergehend zu einer Umverteilung von *Raft*-assoziierten Proteinen kommt (Cross, 2004)(Shadan et al., 2004)(van Gestel et al., 2005)(Thaler et al., 2006). Daraus ergibt sich die

Frage, ob sich die beobachtete DIG-Assoziation von MUPP1 ebenfalls mit der Kapazitierung verändert.

Um diese Frage zu klären, wurden epididymale Rattenspermien nach der Isolierung für 1,5 h kapazitiert und anschließend für die Herstellung Detergenz-unlöslicher Fraktionen genutzt. In einem parallelen Ansatz wurden die Spermien mit Methyl- β -Cyclodextrin behandelt um der Membran das Cholesterol partiell chemisch zu entziehen (Niu et al., 2002). Mit Hilfe der Westernblot-Technik wurde an diesen unterschiedlich aufbereiteten Proben anschließend überprüft, ob die Kapazitation bzw. die partielle chemische Extraktion des Cholesterols aus der Membran einen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung des MUPP1 hat.

Wie in Abbildung 5.7B dargestellt, führte die Kapazitation der Spermien dazu, dass das Caveolin 1 nicht mehr ausschließlich in der Detergenz-unlöslichen Fraktion (P_{TX}) sondern vermehrt auch in der löslichen Fraktion (S_{TX}) nachzuweisen war. Im Gegensatz dazu zeigte MUPP1, unabhängig vom Kapazitationzustand der Spermien, das gleiche Verteilungsmuster: MUPP1 war weiterhin ausschließlich in der Detergenz-unlöslichen Fraktion (P_{TX}) nachweisbar, während in der löslichen Fraktion praktisch keine Immunreaktivität zu sehen war (s. Abb. 5.7) (Ackermann et al., 2008). Ein vergleichbares Verteilungsmuster wurde auch nach partieller Extraktion des Cholesterols durch Methyl- β -Cyclodextrin beobachtet: Auch hier war Caveolin 1 vermehrt in der Detergenz-löslichen Fraktion nachzuweisen, wohingegen MUPP1 weiterhin ausschließlich in der angereicherten DIG-Fraktion konzentriert war (s. Abb. 5.7C; P_{TX}). Die Assoziation von MUPP1 mit Detergenz-unlöslichen Membranmikrodomänen scheint sich also durch die Kapazitierung der Keimzellen nicht zu verändern. Da das Adapterprotein MUPP1 ursprünglich im Gehirn identifiziert wurde (Sitek et al., 2003), wurde auch im Cortexgewebe der Ratte die Assoziation von MUPP1 an DIGs untersucht. Dazu wurde die oben beschriebene Isolierung von DIGs über ihre Unlöslichkeit in Triton X-100 verwendet. Parallel wurde ein Isolierungsverfahren von *lipid rafts* über eine Detergenz-freie Aufreinigungsmethode durchgeführt, indem die DIGs über einen Saccharosegradienten angereichert wurden (Ostrom and Liu, 2007). Auch in diesen Studien konnte beobachtet werden, dass MUPP1, ähnlich wie Caveolin 1, eine starke Assoziation mit DIGs aufwies (Ackermann et al., 2008) (Daten nicht dargestellt), so dass MUPP1 offenbar generell, unabhängig vom Zelltyp, mit Triton X-100 unlöslichen Mem-

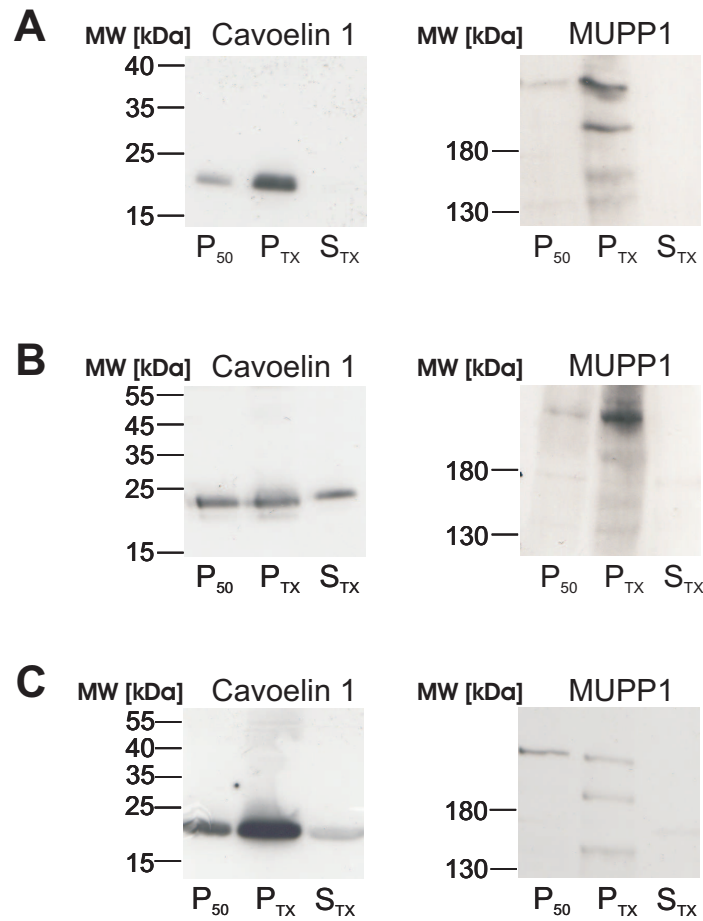


Abbildung 5.7: Westernblot Nachweis von Caveolin 1 und MUPP1 in Triton X-100 löslichen und unlöslichen Membrandomänen aus Rattenspermien.

Dazu wurden DIGs aus nicht kapazitierten **[A]** und kapazitierten **[B]** Rattenspermien mit Hilfe des nicht ionischen Detergenz Triton X-100 aufgereinigt. Als Marker für aufgereinigte DIGs wurde das integrale Membranprotein Caveolin 1 verwendet. Es ist sowohl in nicht-kapazitierten als auch in kapazitierten Spermien jeweils in der DIG-Fraktion angereichert **[A und B, P_{TX}]**, wobei es in kapazitierten Spermien zusätzlich auch in der Detergenz-löslichen Fraktion nachweisbar ist. Das Adapterprotein MUPP1 ist dagegen, unabhängig vom Kapazitierungsstatus der Spermien, ausschließlich in der partiell mit DIGs angereicherten Fraktion zu detektieren **[A und B, P_{TX}]**. Auch der Entzug des Cholesterols aus der Membran durch Methyl- β -Cyclodextrin **[C]** hat keinen Einfluß auf die Assoziation von MUPP1 mit DIGs. Caveolin 1 ist dagegen nach dem Cholesterinentzug, vergleichbar zu kapazitierten Spermien, zu einem geringen Anteil auch in der Detergenz-löslichen Fraktion nachzuweisen **[C, S_{TX}]**.

branmikrodomänen assoziiert ist.

5.2 Identifikation von potentiellen Interaktionspartnern von MUPP1

5.2.1 Befunde eines Hefe-Zwei-Hybrid-Screens

Zur Identifikation potentieller Interaktionspartner von MUPP1 in männlichen Keimzellen wurde ein Hefe-Zwei-Hybrid-Screen durchgeführt. Dazu wurden die N-terminal gelegenen 5 PDZ-Domänen des MUPP1 (s. Abb. 2.7) in einen *bait*-Vektor (pGBKT7) ligiert und mit dem entsprechenden Konstrukt in Hefezellen des Stamms AH109 transformiert. Eine murine cDNA-Bank aus Hodengewebe der Maus wurde als korrespondierendes *prey*-Konstrukt verwendet, wobei die cDNA bereits in Hefezellen des Stamms Y187 transformiert worden war (Clontech, Heidelberg). Durch eine Verpaarung (*mating*) der beiden Hefestämme entstanden diploide Zellen, die anschließend mit Hilfe von Selektionsmedien (-Leu -Trp -His -Ade) auf eine Interaktion des MUPP1 mit Proteinen aus der cDNA Bibliothek selektioniert wurden. Nach dem ersten Ausplattieren der verpaarten Zellen waren etwa 500 Klone auf den Selektionsplatten gewachsen. Um die Spezifität der identifizierten Klone zu verifizieren wurden die erhaltenen Einzelkolonien auf Selektionsplatten mit 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) übertragen. X-Gal wird dabei durch das Enzym β -Galaktosidase, welches bei einer erfolgreichen Protein-Protein-Interaktion in den Hefezellen exprimiert wird, in den blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo umgesetzt. Von den nach dem zweiten Selektionsschritt erhaltenen 200 positiven Klonen wurde anschließend die Plasmid-DNA präpariert, die kodierende cDNA mit Hilfe einer PCR amplifiziert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden dann zur Identifizierung von potentiellen MUPP1-Bindungspartnern mit entsprechenden Datenbankeinträgen verglichen. Neben der Identifizierung möglicher falsch-positiver Bindungspartner, wie ribosomalen Proteinen, Transkriptionsfaktoren oder auch Ubiquitin, die aufgrund der Interaktion der zu untersuchenden Proteine im Zellkern zustande kommt (Fang et al., 2002), *in vivo* aber nicht mit dem cytosolischen MUPP1 interagieren würden, wurde für die in Tabelle 5.2.1 dargestellten Proteine eine Interaktion mit den ersten 5 PDZ-Domänen des MUPP1 festgestellt.

Tabelle 5.1: Identifizierung potentieller Interaktionspartner von MUPP1 (PDZ 1-5) mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Verfahrens.

Potentieller MUPP1 Interaktionspartner	Accession Nummer	Häufigkeit
EGL nine homolog 2	NM053208	7
Nucleoporin like Protein 1 homolog	NM153092	1
Bos taurus retina	AY049726	2
G protein-coupled receptor kinase 7		
Kip1 C-terminus interacting protein-2 (Kic2)	AF068223	1
Rho-GTPase-activating protein 12	Q8C0D4	3
Adaptor-related protein complex AP-4, mu 1	AAH11174	4
basilin, elastin microfibril interfacier 2	AAM53532	1
LDH-A gene for lactate dehydrogenase-A	M27554	1
COP9 homolog	NM013715	2
nucleoporin like 2 (Nupl2)	NM153092	2
enolase 1, alpha, non-neuron	AK019820	1
glutamate receptor-interacting protein 1	AAQ56581	1
inhibitor of growth family, member 1 (Ing1)	NM011919	1
Fbxw9 protein	BC043658	1
FK506 binding protein 4	AK083912	1
tubby-like protein 2	NM008807	1

Für die weitere Analyse einer *in vivo* Interaktion von MUPP1 in Spermien wurden gezielt Kandidaten ausgewählt, die aufgrund ihrer cytosolischen bzw. membranständigen Lokalisation auch subzellulär mit MUPP1 in direktem Kontakt stehen können. Darüberhinaus bestand ein weiteres Auswahlkriterium darin, Proteine zu untersuchen, die potentiell als Signalmoleküle an der Akrosomenreaktion beteiligt sein könnten. Basierend auf diesen Kriterien wurden aus der Tabelle 5.2.1 folgende potentielle MUPP1-Bindungspartner ausgewählt: Das GTPase-aktivierende

Protein der Rho GTPase (RhoGAP12), das *tubby-like 2* Protein, sowie das PDZ-Domänen Protein *glutamate receptor interacting protein1* (GRIP1).

Um die Spezifität der Interaktion der ausgewählten Kandidaten weiter zu verifizieren, wurde die Interaktion mit Hilfe von Co-Transformationsstudien überprüft.

Abbildung 5.8 macht deutlich, dass die Transformanten auf Selektionsmedium

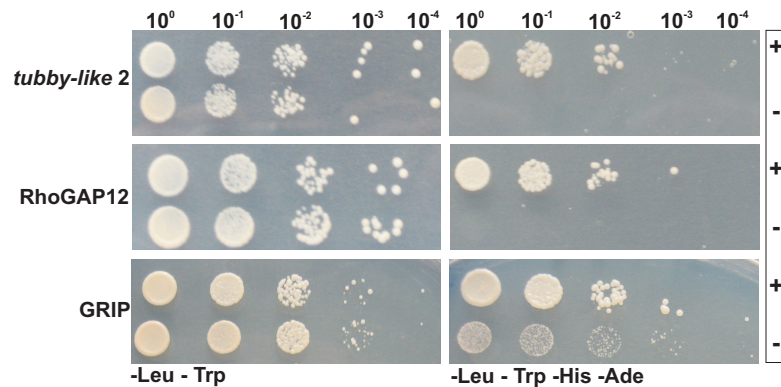


Abbildung 5.8: Spezifitätsnachweis der Interaktion zwischen dem N-terminalen Bereich von MUPP1 und potentiellen im Hefe-Zwei-Hybrid Screen gefundenen Bindungspartnern.

Drei mit Hilfe eines Hefe-Zwei-Hybrid Screens identifizierte Interaktionspartner für MUPP1 wurden durch Co-Transformationsstudien verifiziert. Dazu wurde die Plasmid-DNA der positiven Klone isoliert und zusammen mit dem MUPP1 Konstrukt (PDZ 1-5) (+) oder einem leeren Vektor (pGBKT7) (-) als Kontrolle in Hefen transformiert. Positive Transformanten (-Leu -Trp) wurden zum Test einer positiven Interaktion der beiden transformierten Konstrukte auf Minimalmedien in verschiedenen Verdünnungen (10_0 - 10_{-4}) überstrichen (-Leu -Trp -His -Ade). Alle analysierten potentiellen Interaktionspartner (RhoGAP 12, *tubby-like 2*, GRIP1) zeigten ein deutliches Wachstum auf den Selektionsplatten, während Transformanten mit einem leeren Vektor kein bzw. ein sehr geringes Wachstum zeigten.

(-Leu -Trp -His -Ade) ein deutliches Wachstum zeigten [+], wohingegen Hefen des Kontrollansatzes [-] mit einem leeren Vektor kein bzw. nur ein sehr schwaches Wachstum auf den Minimalmedium aufwiesen (-Leu -Trp -Hid -Ade), so dass die ausgewählten Kandidaten tatsächlich spezifisch mit dem N-Terminus des MUPP1 (PDZ-Domänen 1-5) interagieren (s. Abb. 5.8).

Interessanterweise besitzt das identifizierte GRIP1 Protein, vergleichbar zu MUPP1, 7 PDZ-Domänen, die die korrekte Membranlokalisation von AMPA-sensitiven Glutamaterezeptoren aber auch eine Komplexierung dieses Glutamaterezeptorsubtyps mit Cytoskelettelementen an der Postsynapse vermittelt (Sheng and Pak, 1999).

Jüngste reproduktionsbiologische Studien haben gezeigt, dass GRIP1 in Spermien spezifisch an die PLC δ 4 bindet (Irimo et al., 2005), ein Schlüsselenzym der akrosomalen Exocytose, das nach Bindung des Spermiums an die Zona pellucida einen Calciumanstieg in den Spermien auslöst (Fukami et al., 2003). Eine Deletion der PLC δ 4 führte zu einem vollständigen Verlust der Fähigkeit der Spermien zur Akrosomenreaktion, was zur Folge hat, dass die Tiere infertil sind (Fukami et al., 2001). Daher ist vorstellbar, dass MUPP1 zusammen mit GRIP1 in Spermien einen Signalkomplex bildet, der funktionell an der Akrosomenreaktion beteiligt ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, haben wir zunächst damit begonnen auf Ebene der Spermien zu analysieren, ob dort eine Co-Lokalisation von MUPP1 und GRIP1 vorliegt. Dazu wurden immunocytochemische Färbungen mit einem anti-GRIP1-Antikörper durchgeführt. Die Befunde dieser Studien zeigten allerdings, dass GRIP1 ausschließlich im Schwanz und nicht im Kopf der Spermien nachzuweisen war (Daten nicht dargestellt), so dass eine Interaktion von MUPP1 mit GRIP1 in Spermien ausgeschlossen werden kann. Die übrigen Proteine wurde bisher noch nicht weiter analysiert.

5.2.2 Die Calcium/Calmodulin abhängige Proteinkinase II ist im Akrosom von Spermien verschiedener Säugerspezies lokalisiert

Neben der Identifizierung von potentiellen bisher unbekannten Interaktionspartner für MUPP1 mit Hilfe der Hefe-Zwei-Hybrid Technik wurden auch bereits identifizierte Bindungspartner aus anderen Geweben, wie die CaMKII aus dem Hippocampus (Krapivinsky et al., 2004), auf eine Interaktion mit MUPP1 im Keimdrüsengewebe untersucht.

Zunächst wurde in Westernblot-Analysen und immunocytochemischen Studien allerdings geprüft, ob die CaMKII im Keimdrüsengewebe und in reifen Spermien verschiedener Säuger vorhanden ist bzw. in welchen subzellulären Kompartimenten die Kinase lokalisiert ist. Für die durchgeführten Westernblot-Studien wurden Solubilisate aus Hoden- und Nebenhodengewebe der Ratte bzw. der Maus hergestellt, über ein SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem anti-CaMKII-Antikörper inkubiert, der die C-terminale Region (aa 448 - 460) der CaMKII α erkennt. Als

Positivkontrolle diente entsprechend aufbereitetes Cortexgewebe der Ratte und der Maus (Lamsa et al. 2007).

Abbildung 5.9 zeigt, dass der eingesetzte Antikörper sowohl im Cortexgewebe als auch in Hoden- und Nebenhodengewebe von Maus und Ratte ein Protein mit einer molekularen Größe detektiert, die sich aus der Sequenz der CaMKII α ableitet (52 kDa) (Griffith, 2004b) (s. Abb. 5.9A). Zusätzlich wird eine immuno-reaktive Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 56 kDa in allen Vergleichsgeweben registriert. Ob diese zusätzlich markierte Bande auf eine Kreuzreaktivität des gegen die α -Untereinheit der CaMKII gebildeten Antikörpers mit der relativ homologen ca. 56 kDa großen β -Untereinheit zurückzuführen ist (Yamauchi, 2005) oder eine Splicevariante der CaMKII α darstellt (Suznovich et al., 2007), ist bisher noch nicht klar.

Um weiter zu prüfen, ob die CaMKII auch in reifen Spermatozoen von Säugern nachzuweisen ist, wurden isolierte epidydimale (Maus/Ratte) und ejakulierte (bovine/human) Spermien verschiedener Säugerspezies in Westernblot-Analysen mit dem gegen die α -Untereinheit der CaMKII gerichteten Antikörper untersucht. In allen Spermienproben war dabei eine Bande der korrespondierenden Größe für die α -Untereinheit von 52 kDa nachweisbar (s. Abb. 5.9B). Die in testikulärem Gewebe detektierte Bande von ca. 56 kDa konnte in den Spermienproben interessanterweise nicht mehr nachgewiesen werden.

Um zu überprüfen, ob die identifizierte CaMKII in Säugerspermien tatsächlich eine Co-Lokalisation mit MUPP1 im Akrosom aufweist und damit als physiologischer Bindungspartner des PDZ-Domänen Proteins in Betracht kommt, wurde in weiteren Studien die subzelluläre Lokalisation der Kinase in Spermien bestimmt. Dazu wurden immuncytochemische Färbungen an Spermien der Maus und des Menschen durchgeführt. Die Keimzellen wurden zunächst mit eiskaltem Methanol fixiert und anschließend mit dem Antikörper gegen die CaMKII α -Untereinheit inkubiert. Wie in Abbildung 5.10 deutlich wird, markiert der verwendete anti-CaMKII α -Antikörper tatsächlich den Bereich des Akrosoms in Spermien der Maus (s. grüne Markierung Abb. 5.10A). Der sekundäre Antikörper alleine weist keine Markierung auf (s. Abb. 5.10C). Die akrosomale Lokalisation der Kinase kann auch in humanen Spermien beobachtet werden. Im Bereich des Akrosoms wird das Äquatoralsegment durch den verwendeten Antikörper markiert (s. grüne Markierung

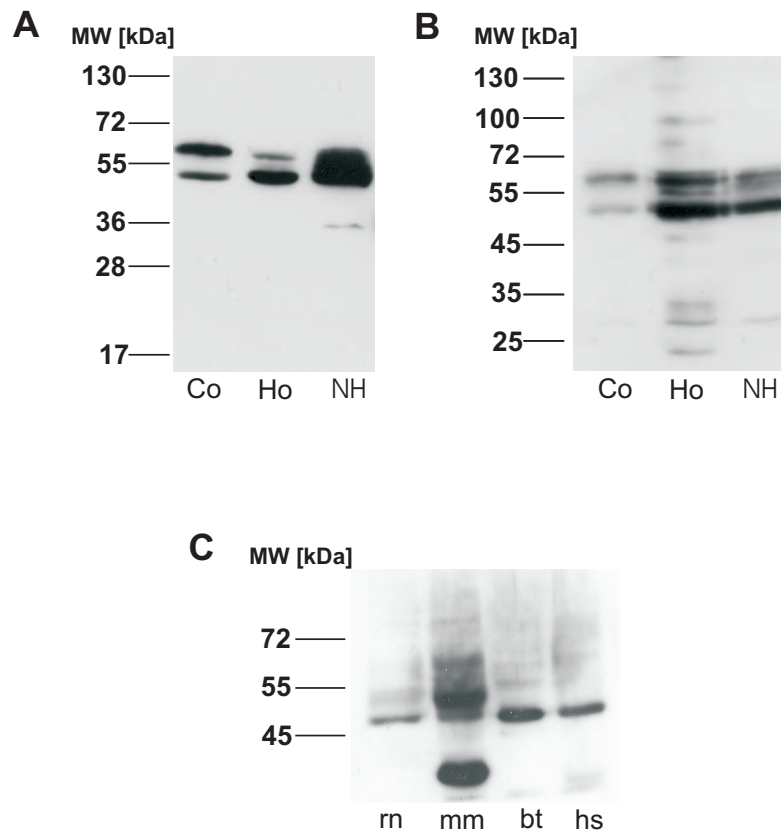


Abbildung 5.9: Nachweis der CaMKII in verschiedenen Gewebeproben mit Hilfe der Westernblot Technik.

Gleiche Proteinmengen fraktionierter Gewebeproben von Cortex [Co], Hoden [Ho] und Nebenhoden [NH] der Maus [A] und der Ratte [B] wurden über ein SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Antikörper, der die C-terminale Region der CaMKII α erkennt, inkubiert. Diese detektiert in allen Proben ein Protein, das der Größe der CaMKII α mit 52 kDa entspricht. Zusätzlich wurde in allen Proben eine Bande mit einem Molekulargewicht von 56 kDa registriert.

[C] Gleiche Proteinmengen von Spermienhomogenisaten verschiedener Säugerspezies (Maus [mm], Ratte [rn], Bulle [bt], Mensch [hs]) wurden nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt und mit dem anti-CaMKII α -Antikörper inkubiert. In allen Proben konnte eine Bande der korrespondierenden Größe für die α -Untereinheit der CaMKII von 52 kDa nachgewiesen werden. Die im Hoden und im Nebenhodengewebe detektierte Bande von 56 kDa konnte in der Spermienprobe nicht mehr nachgewiesen werden.

Abb. 5.10B). Die Kontrolle ohne den Primärantikörper zeigt keine Immunreaktivität. In humanen Spermien wird zusätzlich zum akrosomalen Bereich ein kurzer Bereich des Schwanzes am Übergang zum Kopf durch den Antikörper markiert (s.

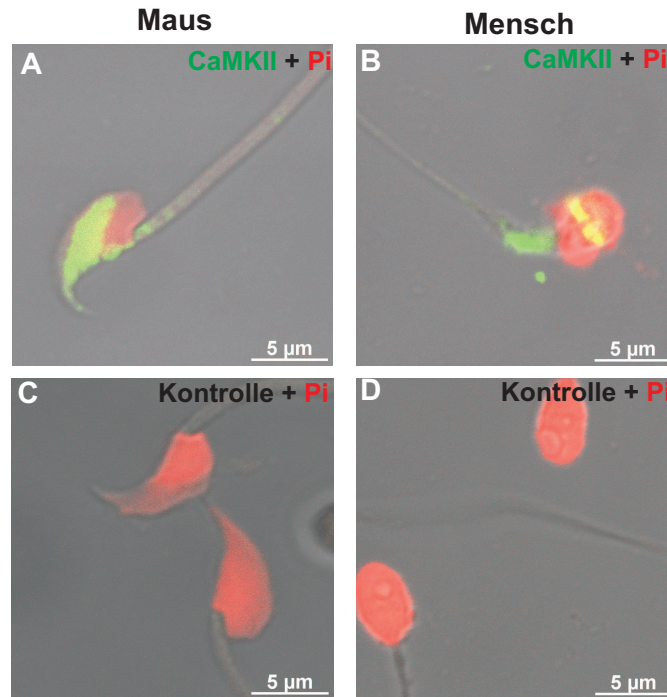


Abbildung 5.10: Subzelluläre Lokalisation der CaMKII in murinen und humanen Spermien. Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation der CaMKII in Spermien wurden immunocytochemische Färbungen mit einem anti-CaMKII α -Antikörper durchgeführt. Zusätzlich wurde im Bereich des Kopfes der Spermien der Zellkern mit Hilfe von Propidiumjodid [Pi] rot angefärbt.

[A] Immunocytochemische Färbungen an Spermien der Maus. Ein anti-CaMKII α -Antikörper markiert ausschließlich den akrosomalen Bereich der Spermien (grün).

[B] In menschlichen Spermien wird nur das Äquatoralsegment, sowie das Mittelstück des Schwanzes durch den verwendeten Antikörper markiert. In den Kontrollen, in denen die Spermien mit dem Sekundärantikörper alleine inkubiert wurden (Maus [C]; und Mensch [D]) ist in beiden Fällen keine Markierung zu detektieren.

Abb. 5.10B).

Die immunocytochemischen Färbungen geben einen Hinweis darauf, dass die CaMKII im Bereich des Akrosoms von Spermien lokalisiert ist.

5.2.3 Die CaMKII ist mit DIGs assoziiert

Die CaMKII konnte kürzlich sowohl in heterologen Expressionsstudien als auch in kultivierten corticalen Neuronen in *raft*-Membranmikrodomänen nachgewiesen werden (Du et al., 2006) (Suzuki et al., 2008). Um zu prüfen, ob die in Spermatozoen identifizierte CaMKII ebenfalls in *rafts* lokalisiert ist und damit möglicher-

weise eine Co-Lokalisation mit MUPP1 aufweist (s. Abb. 5.7), wurden Detergenz-unlösliche Membranmikrodomänen aus Rattenspermien, sowie als Positivkontrolle aus Cortexgewebe, hergestellt und in Westernblot-Analysen auf eine Assoziation mit der CaMKII untersucht.

Abbildung 5.11 zeigt, dass die subzelluläre CaMKII-Verteilung in Rattenspermien derjenigen in corticalen Hirngewebe entspricht: In beiden Gewebefraktionen detektiert der verwendete Antikörper in der Mikrosomenfraktion (P_{50}), die als Ausgangsmaterial für die Isolierung der DIGs eingesetzt wurde, die zu erwartende Bande mit einer molekularen Größe von 52 kDa. Vergleicht man die Markierung in der Triton X-100 löslichen (S_{TX}) Fraktion mit der DIG-Fraktion (P_{TX}) wird deutlich, dass sowohl im Hirngewebe als auch in Spermien die CaMKII lediglich in der *raft*-Fraktion nachzuweisen ist, wohingegen in der Triton X-100 löslichen Fraktion (S_{TX}) keine Immunmarkierung auszumachen ist (s. Abb. 5.11).

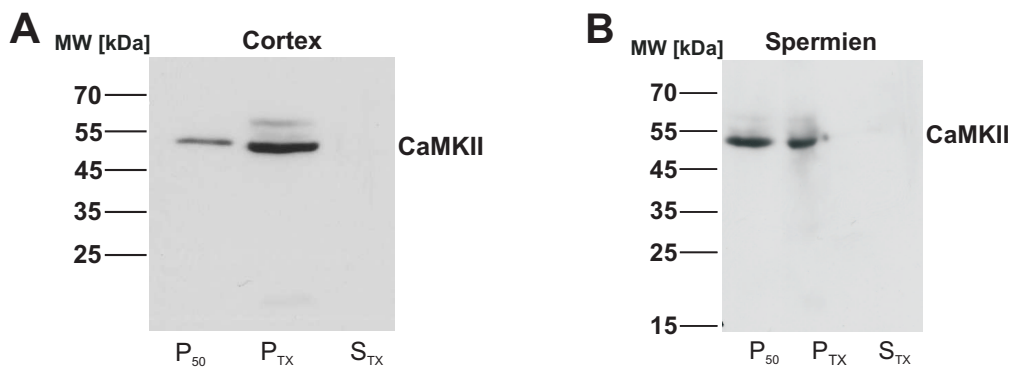


Abbildung 5.11: Die CaMKII ist mit DIGs im Cortex und in Spermien der Ratte assoziiert.

Zur Analyse, ob die CaMKII an Membranmikrodomänen innerhalb der Plasmamembran assoziiert ist, wurden DIGs sowohl aus dem Cortex als auch aus Spermien der Ratte aufgereinigt. Mit Hilfe der Westernblot-Technik wurde anschließend die Verteilung der Kinase untersucht.

[A] Aufreinigung von DIGs aus Cortexgewebe der Ratte. Die CaMKII ist neben der Mikrosomenfraktion (P_{50}) ausschließlich in der Fraktion mit DIGs (P_{TX}) nachzuweisen. [B] Aufreinigung von DIGs aus Spermien der Ratte. Die subzelluläre Verteilung der Kinase entspricht in Spermien der beobachteten Verteilung im Hirngewebe: Neben einer Immunmarkierung in der Mikrosomenfraktion (P_{50}) ist die CaMKII ausschließlich in der mit *lipid rafts* angereicherten Fraktion zu detektieren (P_{TX}).

5.2.4 Die CaMKII als ein Interaktionspartner für das Adapterprotein MUPP1

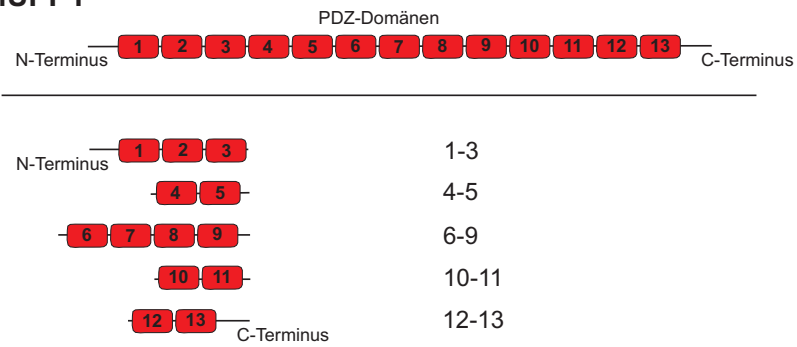
Um zu überprüfen, ob die im Keimdrüsengewebe identifizierte CaMKII, die auf subzellulärer Ebene mit MUPP1 co-lokalisiert zu sein scheint, auch im Hoden, vergleichbar zum Hippocampus (Krapivinsky et al., 2004), einen Komplex mit MUPP1 bildet, wurden GST *Pull down* Experimente mit Hodensolubilisaten und nicht überlappenden MUPP1-Konstrukten (M1-3, M4-5, M6-9, M10-11, M12-13) durchgeführt (s. Abb. 5.12A). Als Kontrolle wurde ein Konstrukt der GST ohne MUPP1 aufgereinigt und parallel eingesetzt.

Für den eigentlichen *Pull down* wurden von allen aufgereinigten Fusionsproteinen gleiche Proteinmengen eingesetzt und an eine Gluthation-Sepharose-A-Matrix immobilisiert. Zur Co-Präzipitation von Interaktionspartnern wurde das so vorbehandelte Säulenmaterial mit den gebundenen GST-Fusionsproteinen mit löslichen S1-Überständen aus Hodengewebe der Ratte ü. N. bei 4 °C inkubiert. Nach mehreren Waschschritten zum Entfernen von ungebundenem Lysat wurde anschließend mit Hilfe der Westernblot-Technik überprüft, ob die CaMKII mit einem der MUPP1-Konstrukte präzipitiert werden konnte ist. Abbildung 5.12 zeigt, dass eine Bande der korrespondierenden Größen für die α -Untereinheit der CaMKII von 52 kDa (Griffith, 2004b) lediglich im Präzipitat des Konstrukts M10-11 detektiert werden konnte. Weder für die übrigen Fusionsproteine noch für die Negativkontrolle (GST) war eine Immunreaktivität für die CaMKII nachzuweisen (s. Abb. 5.12A). Eine positive Interaktion zwischen der Kinase und MUPP1 ist im Hodengewebe somit ausschließlich für die PDZ-Domänen 10 und 11 zu beobachten.

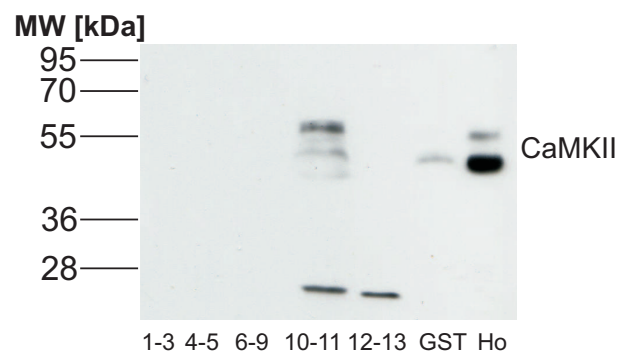
In Präparationen des Hippocampus konnte zusätzlich beobachtet werden, dass die Aktivierung der CaMKII durch Calcium/Calmodulin die Interaktion mit MUPP1 unterbindet (Krapivinsky et al., 2004). Daher wurde in einem parallelen Ansatz überprüft, ob die Aktivierung der Kinase auch im Hodengewebe eine Auswirkung auf die beobachtete Interaktion zwischen MUPP1 und der CaMKII hat (s. Abb. 5.12C). Die Inkubation verschiedener GST-Fusionsproteine mit Hodensolubilisat, das zusätzlich mit CaCl_2 und Calmodulin versetzt wurde, führte dazu, dass die Interaktion nicht länger nachzuweisen war (s. Abb. 5.12C). Unter diesen Bedingungen konnte die Kinase nur in dem ursprünglich für den *Pull down* eingesetzten

A

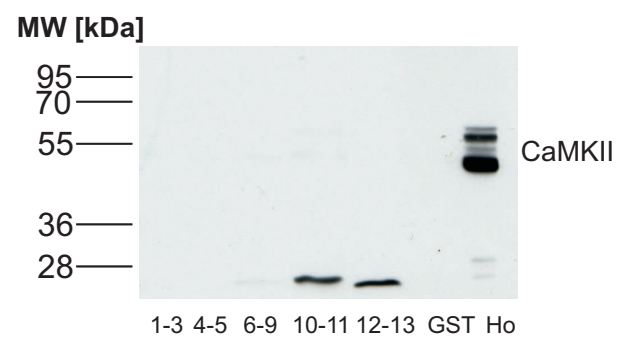
MUPP1



B



C



Hodensolubilisat, nicht aber im Präzipitat einer der Fusionsproteine, nachgewiesen werden.

5.3 Analysen zur funktionellen Rolle der CaMKII während der akrosomalen Exocytose in Mausspermien

5.3.1 Der Calmodulin Antagonist W7 potenziert die spontane akrosomale Sekretionsrate in Mausspermien

Aufgrund der Beobachtungen, dass die CaMKII ein Interaktionspartner für das Adapterprotein MUPP1 ist, war es essentiell zu prüfen, ob die Kinase selbst auch funktionell an der akrosomalen Exocytose beteiligt ist. Da die Kinase durch die Bindung von Ca/CaM autophosphoryliert und damit aktiviert wird (Griffith, 2004a) wurde zunächst der Effekt des Calmodulin Antagonisten W7 auf die Akrosomenreaktionsrate der Mausspermien untersucht. Dazu wurden isolierte und kapazitierte Spermien zuerst mit unterschiedlichen Konzentrationen des membranpermeablen Calmodulin-Antagonisten W7 (20 - 100 μ M) inkubiert (Bendahmane

Abbildung 5.12: MUPP1 bildet mit der CaMKII α in Hodengewebe einen Komplex. Zum Nachweis, dass die CaMKII α auch im Hodengewebe ein Interaktionspartner für MUPP1 ist, wurden GST *pull down* Experimente durchgeführt. [A] Dazu wurden verschiedene nicht überlappende MUPP1-GST-Fusionsproteine (M1-3, M4-5, M6-9, M10-11, M12-13) eingesetzt. [B] Die GST-Fusionsproteine wurden in *E.coli* Zellen exprimiert, aufgereinigt, an eine Glutathion-Sepharose-A-Matrix immobilisiert, mit löslichen Überständen aus Hodengewebe inkubiert und anschließend mit Hilfe der Westernblot-Technik auf die Bindung der CaMKII α untersucht. Die CaMKII α kann neben dem im *Pull down* eingesetzten Ausgangssolubilisat (Ho) nur im Präzipitat des Fusionsproteins M10-11 mit Hilfe eines anti-CaMKII α -Antikörper nachgewiesen werden. In den übrigen Präzipitaten sowie in der Kontrolle mit GST alleine kann keine Bande der entsprechenden Größe nachgewiesen werden. Kleinere Proteolyseprodukte können sowohl für die Fusionsproteine M10-11 als auch für M12-13 detektiert werden. [C] Zum Nachweis, ob die beobachtete Interaktion von MUPP1 und CaMKII α auch in der Anwesenheit von Calcium/Calmodulin stattfindet, wurde in einem parallelen Ansatz ein *Pull down* mit Hodensolubilisat durchgeführt, das mit CaCl₂ und Calmodulin versetzt wurde. Die Anwesenheit von Calcium/Calmodulin hat zur Folge, dass die Kinase in keinem der Präzipitate mehr nachzuweisen war, nur die zuvor schon beobachteten Proteolyseprodukte können für M10-11 und M12-13 detektiert werden.

et al., 2001). Anschließend wurde in einem Teil der Ansätze die Akrosomenreaktion durch das Calciumionophor A23187 ausgelöst. Parallel dazu wurde in einem weiteren Kontrollansatz die spontane Akrosomenreaktionsrate ohne die Zugabe von W7 und A23187 bestimmt und als 100 % gesetzt.

Abbildung 5.13 zeigt, dass in dem Ansatz, in dem die Spermien lediglich mit dem Calmodulin-Antagonisten W7 inkubiert wurden (- A23187; + 20 μ M), eine Akrosomenreaktionsrate zu registrieren war, die bereits der Positivkontrolle (+ A23187; 161,6 % \pm 2,9) entsprach (184,1 % \pm 11,1; $p < 0,001$) (s. Abb. 5.13; + 20 μ M W7, - A23187). Dieser Effekt ließ sich durch eine höhere W7-Konzentration (50 μ M; 217,3 % \pm 11,8; $p < 0,001$) sogar noch steigern, bevor bei einer Konzentration von 100 μ M W7 eine Sättigung der Akrosomenreaktionsrate erreicht wurde (219,1 % \pm 13,9; $p < 0,001$) (s. Abb. 5.13; + 50 μ M u. 100 μ M W7; - A23187). Auffällig ist, dass die alleinige Inkubation der Spermien mit W7 dazu führt, dass die Spermien eine deutlich erhöhte spontane Akrosomenreaktion aufwiesen.

5.4 Der CaMKII Inhibitor KN93 hat einen potenzierenden Effekt auf die spontane Akrosomenreaktionsrate in Mausspermien

Um eine Aussage darüber treffen zu können ob der beobachtete Effekt der Calmodulin Hemmung durch W7 auf die spontane Akrosomenreaktionsrate aufgrund einer Beeinflussung der CaMKII in den Mausspermien zustande kommt oder unabhängig von der Kinase ist wurden zusätzliche Versuche mit dem direkten Inhibitor der CaMKII KN93 (Luo et al., 2008) durchgeführt. Dazu wurden isolierte und kapazitierte Mausspermien mit KN93 und seinem inaktiven Analog KN92 inkubiert. Anschließend wurde in einem Teil der Ansätze die Akrosomenreaktion durch das Calciumionophor A23187 ausgelöst. Parallel dazu wurde in einem Kontrollansatz die spontane Akrosomenreaktionsrate ohne KN93 und A23187 Behandlung bestimmt und als 100 % gesetzt.

Abbildung 5.14 zeigt, dass in dem Ansatz, in dem die Spermien zwar mit dem Inhibitor KN93, allerdings ohne das Ionophor A23187 inkubiert wurden (- A23187; + KN93), eine spontane Akrosomenreaktionsrate zu registrieren war, die im Ver-

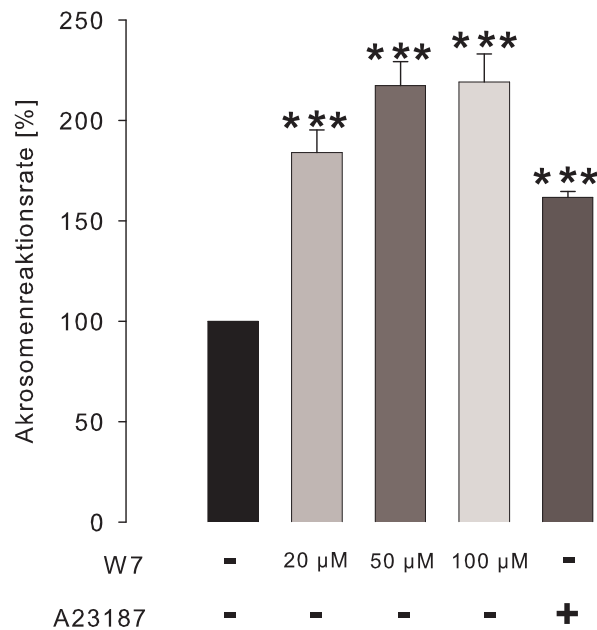


Abbildung 5.13: Der Calmodulin-Antagonist W7 hat einen potenzierenden Einfluss auf die spontane Akrosomenreaktionsrate in Mausspermien.

Zur Analyse der funktionellen Rolle der CaMKII während der Akrosomenreaktion wurden kapazitierte Mausspermien mit dem membrangängigen Calmodulin Antagonisten W7, oder A23187 inkubiert. In allen Ansätzen wurde der Anteil der Spermien bestimmt, die eine Akrosomenreaktion durchlaufen haben und als Prozent der spontanen Akrosomenreaktionsrate ohne W7 und A23187 (100 %) dargestellt.

Es wird deutlich, dass bereits 20 µM W7 zu einer erhöhten spontanen akrosomalen Exocytose führten ($184,15 \pm 11,1$ %; $p < 0,001$). Durch eine höhere W7 Konzentration (50 µM) konnte diese Sekretionsrate noch weiter gesteigert werden ($217,3 \pm 11,8$ %; $p < 0,001$). Bei einer W7 Konzentration von 100 µM wird allerdings eine annähernde Sättigung erreicht ($219,1 \pm 13,9$ %; $p < 0,001$). Auffällig ist, dass die Spontanrate in Zellen, die mit W7 behandelt wurden im Konzentrationsbereich von 50 bzw. 100 µM sogar signifikant höher ist, als die durch A23187 induzierte Akrosomenreaktionsrate in Spermien ohne eine vorherige W7 Inkubation. Die Daten sind Mittelwerte aus 14 Einzelerperimenten, wobei die Spermien der einzelnen Experimente jeweils von unterschiedlichen Mäusen stammen.

gleich zur Kontrolle ohne KN93 und ohne A23187 signifikant erhöht war ($130,9\% \pm 9,9$ $p < 0,01$). Das inaktive Analog KN92 hatte dagegen keinen Effekt auf die spontane Rate der akrosomalen Exocytose der Spermien, sie war vergleichbar zur Kontrolle bei $98,9\% \pm 5,7$. Durch A23187 konnte eine maximale induzierte Akro-

somenreaktionsrate von $209,5 \% \pm 10,6$ im Vergleich zur spontanen Rate in den nicht behandelten Spermien (100 %) erreicht werden.

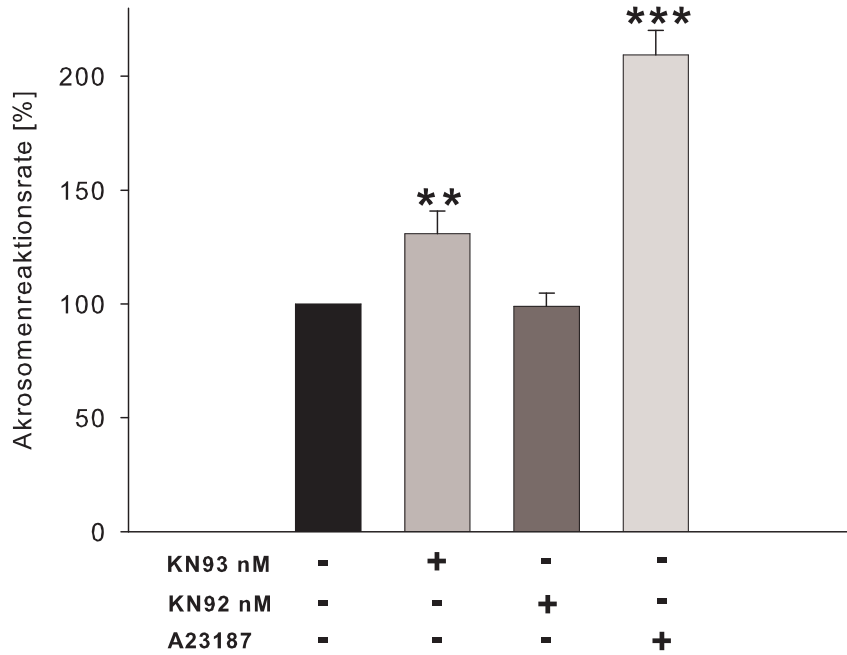


Abbildung 5.14: Der CamKII Inhibitor KN93 hat einen potenzierenden Einfluss auf die spontane Akrosomenreaktionsrate in Mausspermien.

Zur Analyse der funktionellen Rolle der CaMKII während der Akrosomenreaktion wurden kapazitierte Mausspermien mit dem membrangängigen CamKII Inhibitor KN93, dem inaktiven Analog KN92 oder A23187 inkubiert. In allen Ansätzen wurde der Anteil der Spermien bestimmt, die eine Akrosomenreaktion durchlaufen haben und als Prozent der spontanen Akrosomenreaktionsrate ohne KN93/92 und A23187 (100 %) dargestellt. Dabei wird deutlich, dass Spermien, die mit dem Inhibitor KN93 (200 nM) inkubiert wurden, eine erhöhte Spontanrate gegenüber Spermien zeigen, die nicht mit KN93 behandelt wurden ($130,9 \pm 9,9$ %; $p < 0,01$). Das inaktive Analog KN92 (600 nM) hatte dagegen keinen Effekt auf die spontane Rate der akrosomalen Exocytose ($98,9 \pm 5,7$). Durch die Stimulation mit A23187 wird eine maximale Akrosomenreaktionsrate von $209,4 \pm 10,6$ ($p < 0,001$) im Vergleich zur Negativkontrolle (ohne KN93/92, ohne A23187) erreicht. Die Daten sind Mittelwerte aus 7 Einzelerperimenten, wobei die Spermien der einzelnen Experimente jeweils von unterschiedlichen Mäusen stammen.

6 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Adapterprotein MUPP1 in Säugerspermien vorkommt und ausschließlich im Bereich des Akrosoms zwischen akrosomaler Membran und Plasmamembran lokalisiert ist (Heydecke et al., 2006) (Ackermann et al., 2008). Darüber hinaus zeigte sich, dass dieses spezialisierte Gerüstprotein subzellulär mit Detergenz-unlöslichen Membranmikrodomänen der Spermien assoziiert ist (s. Abb. 5.7) (Ackermann et al., 2008), und seine Konzentrierung in *lipid rafts* unabhängig vom Reifungszustand der Keimzellen ist (s. Abb. 5.7) (Ackermann et al., 2008). Stimulierungsexperimente zeigten außerdem, dass MUPP1 an den frühen Reaktionen (*tethering* und *docking*) des sequentiell verlaufenden akrosomalen Exocytoseprozesses beteiligt ist (s. Abb. 5.6) (Ackermann et al., 2008). Die ebenfalls im Akrosom (s. Abb. 5.10) lokalisierte, *lipid raft*-assoziierte (s. Abb. 5.11) CaMKII konnte als eine Komponente des über das MUPP1-Adapterproteins gebildeten möglichen Signalkomplexes identifiziert werden (s. Abb. 5.12). Zudem ergaben Studien, in denen kapazitierte Mausspermien mit dem membranpermeablen CaMKII-spezifischen KN93-Inhibitor vorinkubiert wurden, dass durch die Blockierung der CaMKII die spontane Akrosomenreaktionsrate der Spermien potenziert wird (s. Abb. 5.14). Der gleiche Effekt wurde auch nach der Behandlung der Spermien mit dem Calcium/Calmodulin Antagonisten W7 beobachtet (s. Abb. 5.13).

Die Akrosomenreaktion ist eine besondere Form der Calcium-regulierten Exocytose, die auffällige funktionelle Analogien zur Vesikelfusion an der neuronalen Synapse aufweist (Mayorga et al., 2007) (Tomes, 2007), sich aber in einigen entscheidenden mechanistischen Prinzipien erheblich von der vesikulären Transmitterausschüttung an der Präsynapse unterscheidet. Zum einen kommt es während der akrosomalen Exocytose im Gegensatz zur Fusion an der Präsynapse nur zur Ver-

schmelzung eines einzelnen sehr großen Vesikels. Zum anderen bilden sich zeitlich synchron eine Vielzahl von Fusionsporen an der Plasmamembran des Spermiums aus (Breitbart, 2002a), während bei dem Verschmelzungsprozess eines Transmittervesikels offenbar nur eine oder einige wenige Kontaktstellen zwischen Vesikel und Plasmamembran ausgebildet werden (Lang and Jahn, 2008). Und schließlich ist es eine zentrale Besonderheit der Akrosomenreaktion, dass sie nur ein einziges Mal während der gesamten Lebensdauer eines Spermiums von diesem durchlaufen wird (Florman et al., 2008), weshalb diese, um eine erfolgreiche Befruchtung zu gewährleisten, immer mit größtmöglicher Effizienz und Präzision ablaufen muss (Liu and Baker, 2004). Gleichzeitig muss die Zelle aber auch sicherstellen, dass ein unbeabsichtigtes Exocytose-Ereignis unbedingt verhindert wird. Studien in anderen biologischen Systemen haben gezeigt, dass sequentiell-gekoppelte Reaktionen besonders präzise und effizient ablaufen, wenn durch die räumliche Organisation beteiligter Enzyme eine Limitierung der Diffusionswege realisiert wird (Bray, 1998), daher liegt die Vermutung nahe, dass die zeitlich aufeinander folgenden Reaktionen der akrosomalen Exocytose mit den entsprechenden Funktionselementen der beteiligten Signalwege, sowohl zeitlich als auch räumlich koordiniert sein könnten. Gerüstproteine sind aufgrund ihrer Protein-Protein Interaktionsdomänen geeignete Kandidaten für die Organisation von subzellulären Transduktionseinheiten, die die Genauigkeit einer molekularen Reaktion sicherstellen können (zur Übersicht s. (Huber, 2001) (Andreeva et al., 2007)). Tatsächlich zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an permeabilisierten Mausspermien, dass das im Bereich des Akrosoms von Spermien perlschnurrartig zwischen akrosomaler und Plasmamembran zu findende Adapterprotein MUPP1 (Heydecke et al., 2006) (Ackermann et al., 2008) funktionell an der akrosomalen Exocytose beteiligt ist (s. Abb. 5.4) (Ackermann et al., 2008). Damit könnte MUPP1, ähnlich wie Piccolo, Bassoon, Munc13 und Rim an der aktiven Zone der Präsynapse (zur Übersicht (Rosenmund et al., 2003)) (Schoch and Gundelfinger, 2006), mit Hilfe seiner 13 PDZ-Domänen eine Art Proteinnetzwerk zwischen den beiden für die Fusion vorgesehenen Membranen aufbauen, das die distinkten und zahlreichen Fusionsorte zwischen Plasmamembran und äußerer akrosomaler Membran prädisponiert. Durch PDZ-PDZ-Interaktionen (Harris and Lim, 2001) (Jemth and Gianni, 2007) mit sich selbst (Homodimere) oder anderen akrosomalen Gerüstproteinen (Hetero-

mere) (Bajpai et al., 2006) (Sutton et al., 2004) wäre MUPP1 zudem dazu geeignet, die synchrone Bildung von Fusionsporen entlang der gesamten Plasmamembran zu ermöglichen, da es die Diffusionswege zwischen Funktionselementen der einzelnen Signalwege verkürzt und so die simultane Sekretion der hydrolysierenden Enzyme sicherstellt.

In dieser Arbeit haben Studien mit inhibitorisch-wirkenden anti-MUPP1-Antikörpern und einem UV-sensitiven Calcium-Chelator auch gezeigt, dass MUPP1 an molekularen Prozessen entweder der Zona pellucida Erkennung und/oder an der Vesikelanlagerung (*tethering* und *docking*) beteiligt ist. Dabei kann eine direkte funktionelle Bedeutung für das eigentliche finale Verschmelzungsereignis ausgeschlossen werden (s. Abb. 5.6) (Ackermann et al., 2008). Die *tethering* und *docking* Prozesse während der akrosomalen Exocytose in Spermien sind noch relativ wenig verstanden. Allerdings haben jüngste funktionelle Untersuchungen gezeigt, dass die monomere GTPase Rab3A (Yunes et al., 2000) (Yunes et al., 2002) (Blas et al., 2005) und die *N-ethylmaleimide-sensitive factor* (NSF) ATPase (Tomes et al., 2005) die Anlagerung des akrosomalen Vesikels vermitteln, so dass sie damit als potentielle Interaktionspartner von MUPP1 in Betracht kommen. Eine Sequenzanalyse des C-Terminus von Rab3A ergab allerdings, dass diese GTPase über kein offensichtliches C-terminales PDZ-Bindemotiv (Jemth and Gianni, 2007) verfügt (Daten nicht dargestellt). Allerdings konnten im Verlauf dieser Arbeit eine Reihe potentieller Bindungspartner von MUPP1, wie das Rho-GAP 12, das *tubby-like* 2 und das *glutamate receptor interacting molecule* (GRIP1) mit Hilfe eines Hefe-Zwei-Hybrid Ansatzes identifiziert werden (s. Tabelle 5.1 und Abb. 5.8). Das Rho-GAP 12 ist eines von ca. 70 Rho-GAP-Regulatorproteinen, das die relativ langsame intrinsische GTPase Aktivität einer zugehörigen Rho-GTPase erhöht und dadurch dessen Aktivierungsphase wesentlich verkürzt (Tcherkezian and Lamarche-Vane, 2007). Die entsprechende Rho-GTPase, die über Rho-GAP 12 reguliert wird, ist bis heute allerdings noch nicht identifiziert worden. Die GTPase-Rho1 nimmt allerdings in der Bäckerhefe *saccharomyces cerevisiae* über die Interaktion mit Sec3, einem Bestandteil des *Tethering*-Exocysts-Komplexes (Kümmel and Heinemann, 2008) (Zhang et al., 2008) direkt Einfluss auf die polarisierte Exocytose in Hefen (Guo et al., 2001). Zudem ist für die Rho GTPase Cdc 42 sogar gezeigt worden, dass sie die Aktin-Polymerisation während der Akrosomenreaktion vermit-

telt (Delgado-Buenrostro et al., 2005). Deshalb scheint es möglich, dass MUPP1 über die Bindung einer speziellen bisher noch nicht bekannten Rho-GTPase und dem hier identifizierten Rho-GAP 12 die Anlagerung des akrosomalen Vesikels reguliert. Ob diese These allerdings *in vivo* tatsächlich zutrifft, muss in weiterführenden Studien geprüft werden.

Ein weiterer, im Rahmen der Interaktionsstudien identifizierter, möglicher Bindungspartner von MUPP1 ist das *tubby-like 2* Protein. Es gehört zu der erst kürzlich identifizierten Proteinfamilie der *tubby-like* Proteine, von denen bis jetzt 4 Mitglieder bekannt sind: Das *tubby* (*tub*), und die *tubby-like* Proteine 1-3 (TULP1-3) (zur Übersicht (Ikeda et al., 2002)). Obwohl die physiologische Funktion der *tubby* Proteine bisher nur ansatzweise verstanden ist (Carroll et al., 2004), wird gegenwärtig diskutiert, dass *tubby* Proteine über die Assoziation an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat an die Membran gebunden und dort einen Komplex mit einem trimeren G-Protein der $G\alpha_q$ Familie bilden (Carroll et al., 2004). Über die Aktivierung eines bisher nicht identifizierten G-Protein gekoppelten Rezeptors wird sowohl das G-Protein als auch die nachgeschaltete PLC stimuliert, wodurch Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat gespalten, *tubby* von der Membran gelöst und IP_3 gebildet wird. Das freie *tubby* wird anschließend in den Zellkern verlagert, wo es die Funktion eines Transkriptionsfaktors übernimmt und direkt Einfluss auf die Genregulation nimmt (Cantley, 2001) (Carroll et al., 2004). Allerdings findet in Spermien keine Transkription mehr statt (Carreau et al., 2007), so dass diese *tubby*-Funktion für männliche Keimzellen kaum wahrscheinlich ist. Die starke *tubby-like 2* Expression im Hoden (Li et al., 2001) könnte aber in einem noch unbekannten funktionellen Zusammenhang mit der über eine PLC-Kaskade vermittelte Akrosomenreaktion stehen (Fukami et al., 2001) (Fukami et al., 2003) (Florman et al., 2008), und über MUPP1 erste Teilschritte der Akrosomenreaktion regulieren.

Ein weiterer identifizierter und möglicher Interaktionspartner von MUPP1 ist das *glutamate receptor interacting protein 1* (GRIP1), das an der Synapse u. a. für den Transport und die Verankerung der AMPA-Glutamaterezeptoren GluR2 und GluR3 verantwortlich ist (Silverman et al., 2007), sowie als Kinesin-Bindungspartner den Transport von dendritischen Vesikeln entlang mikrotubulärer Strukturen vermittelt (Misra and Ziff, 2005). Das aus 7 PDZ-Domänen bestehende Protein wird

u. a. im Hoden exprimiert (Dong et al., 1999), wo es als Interaktionspartner für die PLC δ 4 identifiziert wurde (Fukami et al., 2003), die ein Schlüsselenzym der akrosomalen Exocytose ist (Irimo et al., 2005). Interessanterweise wurde auch für GRIP1 beobachtet, dass es über eine PDZ-PDZ Interaktion sowohl Homo-, als auch Heteromultimere ausbilden kann (Jelen et al., 2003). Damit ist es durchaus möglich, dass GRIP1 in Spermien u. a. mit MUPP1 interagiert und dabei ein großes Signalnetzwerk zwischen der äußeren akrosomalen Membran und der Plasmamembran gebildet wird, in das zentrale Signalmoleküle der Akrosomenreaktion wie die PLC δ 4 in einem funktionellen Komplex zusammengefasst werden. Co-Lokalisationsstudien an Mausspermien, die im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen durchgeführt wurden haben allerdings ergeben, dass kein überlappendes subzelluläres Expressionsmuster zwischen MUPP1 und GRIP1 in Spermien zu beobachten ist: GRIP1 ist im Gegensatz zu MUPP1 in Mausspermien ausschließlich im Schwanz lokalisiert (Daten nicht dargestellt) und kommt nicht als physiologischer Interaktionspartner für das Adapterprotein in Betracht.

Neben diesem potentiellen Interaktionspartner konnte die CaMKII als Interaktionspartner von MUPP1 im Hodengewebe der Ratte analog zum Hippocampus (Krapivinsky et al., 2004) nachgewiesen werden (s. Abb. 5.12). Immuncytochemische Studien sowie subzelluläre Fraktionierungsexperimente haben darüber hinaus gezeigt, dass die erstmalig nachgewiesene CaMKII α Isoform und MUPP1 in der akrosomalen Region (s. Abb. 5.10) sowie in *lipid rafts* (s. Abb. 5.11) colokalisiert sind, was andeuten kann, dass die CaMKII tatsächlich ein physiologischer Interaktionspartner von MUPP1 in Säugerspermien ist. Die GST *pull down* Experimente zeigen allerdings, dass die CaMKII α aus Hodensolubilisat selektiv mit einer Region der PDZ-Domänen 10 und 11 interagiert (s. Abb. 5.12), während die Bindung im Hippocampus hauptsächlich über die PDZ-Domäne 2 und schwächer über die PDZ-Bindungsmotive 5, 6 und 7 erfolgt (Krapivinsky et al., 2004). Die Interaktion zwischen MUPP1 und CaMKII findet aber nicht über ein typisches 4 Aminosäure langes Erkennungsmotiv statt (Hung and Sheng, 2002), sondern offenbar über ein C-terminal gelegenes Haarnadelmotiv (Krapivinsky et al., 2004), wie es auch für die Interaktionsdomäne der Stickstoffmonoxid (NO) Synthase beobachtet wurde (Tochio et al., 2000). Da sich die stark konservierten CaMKII Isoformen

der 4 identifizierten CaMKII Gene (α , β , γ und δ) (Yamauchi, 2005) durch eine Vielzahl von Splice-Varianten auszeichnen (Hudmon and Schulman, 2002), könnte es sein, dass sich die im Gehirne exprimierte Isoform in dem Haarnadel-Motiv von der in Säugerspermien unterscheidet, wodurch eine leicht modifizierte PDZ-Erkennungsregion entsteht (Sheng and Sala, 2001) (Tomita et al., 2001), und damit eine veränderte Bindungsaffinität für die 13 PDZ-Domänen des MUPP1 resultiert (Becamel et al., 2001).

Die CaMKII β Isoform wurde bereits in früheren Untersuchungen in Säugerspermien im Akrosom und im Flagellum nachgewiesen, wobei bisher lediglich beobachtet wurde, dass die CaMKII die Motilität der Spermien beeinflusst (Ignotz and Suarez, 2005) (Schlingmann et al., 2007). In den hier durchgeführten funktionellen Studien wurden erstmalig Hinweise darauf gesammelt, dass die CaMKII möglicherweise auch an der akrosomalen Exocytose beteiligt ist: Der CaMKII Inhibitor KN93, der sich spezifisch in die Calcium/Calmodulin Bindetasche der CaMKII anlagert (Marley and Thomson, 1996) und die Aktivierung der CaMKII durch Ca/CaM verhindert (Griffith, 2004b), verursacht eine signifikante Potenzierung der spontanen Akrosomenreaktion der Spermien (s. Abb. 5.14). Das inaktive Analog KN92 war dagegen wirkungslos (s. Abb. 5.14). Ein vergleichbarer Effekt konnte auch durch den Calmodulin Antagonisten W7 (Hidaka et al., 1981) beobachtet werden; allerdings fällt hier die Potenzierung wesentlich stärker aus (s. Abb. 5.13). Der Calmodulin Antagonist W7 könnte aber auch direkt Calcium aus dem Akrosom freisetzen und so die finalen Fusionsprozesse triggern (Florman et al., 2008), da für ihn in anderen Untersuchungen gezeigt worden ist, dass er auch einen direkten Einfluss auf die Freisetzung von Calcium aus internen Calciumspeichern hat (Jan et al., 2000). Aufgrund dieses unspezifischen Effektes ist bisher auch nicht erklärbar, warum W7 in einigen Untersuchungen die Agonist-induzierte Akrosomenreaktion inhibiert (Bendahmane et al., 2001) (López-González et al., 2001).

Die Studien mit dem Calmodulin und dem CaMKII Inhibitor geben aber insgesamt einen Hinweis darauf, dass die CaMKII offenbar einen regulatorischen Einfluss auf die initialen Prozesse der akrosomalen Sekretionsereignisse hat, indem diese Kinase möglicherweise eine Art frühes Stopp- oder *Clamp* Signal in Form einer Phosphatgruppen-Übertragung auf ein bestimmtes oder mehrere Zielprote-

in/e setzt und damit verhindert, dass die Exocytose ohne den externen Stimulus der durch die Zona pellucida-Bindung stattfindet (s. Abb. 6.1). Ein möglicher Phosphorylierungspartner der CaMKII in Spermien könnte dabei eventuell der Calcium-permeable IP₃-Rezeptor in der akrosomalen Membran von Säugerspermien sein (Walensky and Snyder, 1995), dessen Aktivierung die finalen SNARE-vermittelte Fusionsporenbildung auslöst (Blas et al., 2002) (Herrick et al., 2005). Tatsächlich zeigen Untersuchungen an Myocyten für die dort exprimierte Isoform des Rezeptors IP₃R2, dass über die Phosphorylierung des Rezeptors durch die CaMKII dessen Offenwahrscheinlichkeit signifikant erniedrigt wird (Bare et al., 2005). Die Calcium-Calmodulin-abhängige Aktivierung der CaMKII (Yamauchi, 2005) könnte dabei während des vorangehenden Prozesses der Kapazitierung erreicht werden (Zeng and Tulsiani, 2003). Die Interaktion der CaMKII mit MUPP1 könnte möglicherweise bewirken, dass die cytosolische Kinase und der akrosomale Ionenkanal in räumliche Nähe zueinander gebracht werden, indem MUPP1 direkt mit dem IP₃-Rezeptor interagiert. Eine Inaktivierung der CaMKII durch eine Phosphatase und damit eine unbeabsichtigte Aufhebung des Fusions-*Clamps* könnte dabei, durch eine MUPP1 vermittelte Ausbildung einer proteindichten Mikroregion erreicht werden, ähnlich wie es das PDZ Domänen Protein PSD an der Postsynapse realisiert (Fink and Meyer, 2002). Der sehr schnelle und initiale durch ZP3-vermittelte Einstrom von Calcium durch spannungsabhängige Calciumkanäle (Florman et al., 2008) könnte dann für die Auflösung dieses *Clamps* sorgen, indem die Interaktion zwischen MUPP1 und CaMKII aufgehoben wird. Tatsächlich haben *in vitro* Untersuchungen am Hippocampus (Krapivinsky et al., 2004) und auch an Hodengewebe (s. Abb. 5.12) gezeigt, dass die MUPP1-CaMKII Bindung durch Calcium- und Calmodulin-Zugabe gelöst wird (s. Abb. 5.12), die anschließenden Dephosphorylierungen sowohl des IP₃-Rezeptors als auch der CaMKII würden dann die Blockade der Reaktion aufheben. Damit könnte durch die langsamere G α_q -vermittelte PLC Stimulierung, der Bildung von IP₃ und der dadurch ausgelösten Mobilisierung von Calcium aus dem Akrosom die finalen Prozesse der akrosomalen Exocytose und die Freisetzung der hydrolysierenden Enzyme aus dem Akrosom induziert werden. Ob aber der IP₃-Rezeptor in Säugerspermien tatsächlich einen physiologischen Bindungspartner von MUPP1 darstellt und ob dessen Phosphorylierung durch die CaMKII die spontane Akrosomenreaktionsrate redu-

ziert, muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

Zusammenfassend kann aus den im Verlauf dieser Arbeit gewonnenen Daten folgendes hypothetisches Modell für die funktionelle Rolle von MUPP1 während der Akrosomenreaktion in Spermien aufgestellt werden: MUPP1 ist an den frühen Prozessen der akrosomalen Exocytose beteiligt, die vor dem zweiten Ausstrom von Calcium aus dem Akrosom ablaufen. Es bildet zusammen mit der CaMKII einen funktionellen Komplex, der den Ablauf der Fusion ohne einen exogenen Stimulus über die Phosphorylierung einer Signalkomponente der Signalkaskade verhindert. Erst durch die Stimulation der Kaskade über ZP3 bzw. einen schnellen Calciumeinstrom wird die Kinase aus dem MUPP1-Komplex verdrängt, der Phosphorylierungspartner dephosphoryliert und die Blockade der Reaktion aufgehoben, wodurch es zu der akrosomalen Exocytose und damit der Freisetzung der hydrolysierenden Enzyme aus dem Akrosom kommen kann.

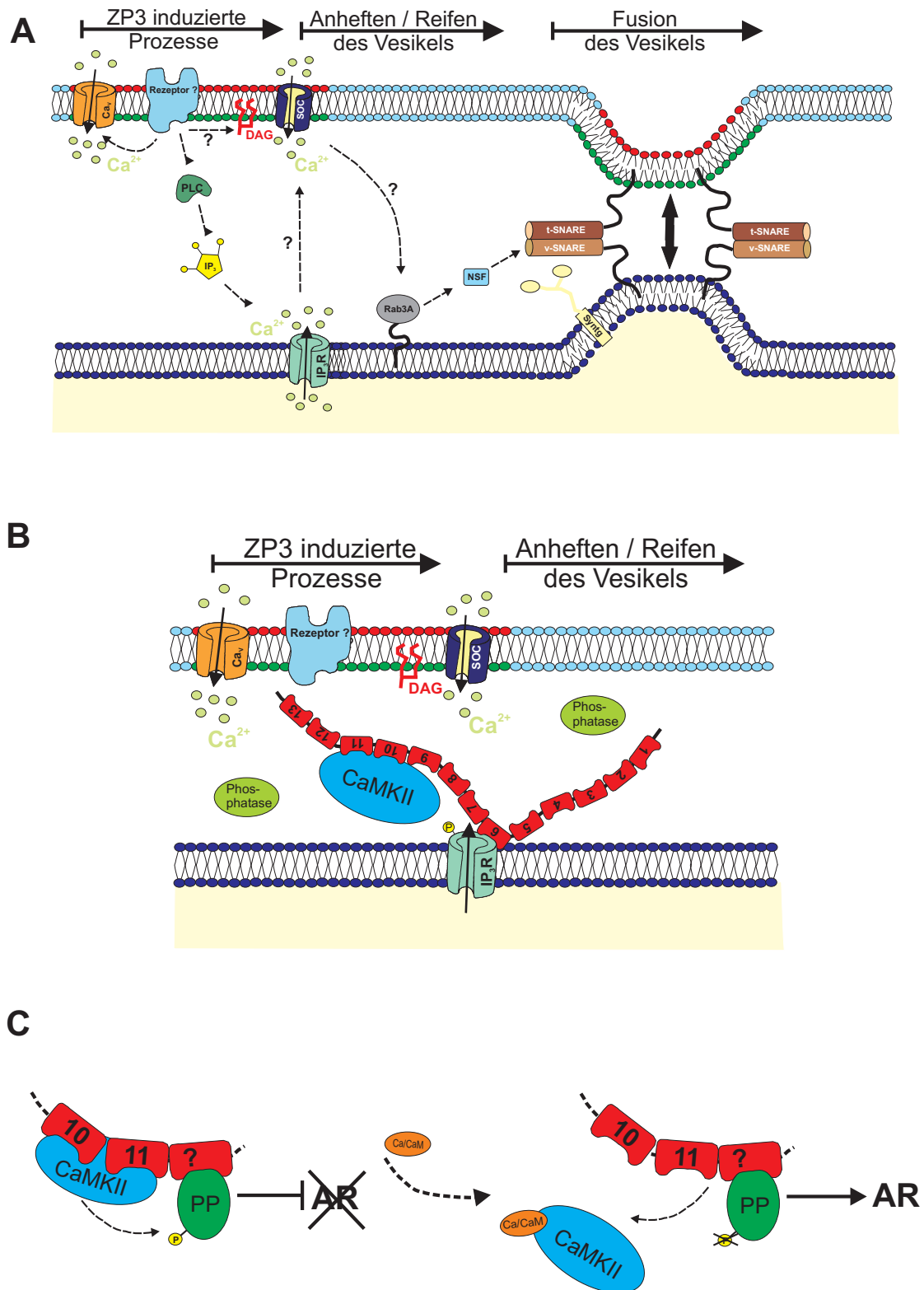


Abbildung 6.1: Hypothetisches Modell zur Funktion von MUPP1 während der Akrosomenreaktion. [A] Die Akrosomenreaktion ist eine spezielle Form der regulierten Exocytose, die aus mehreren gekoppelten und sequentiell-verlaufenden Reaktionen besteht. Induziert durch die Bindung von ZP3 an eine/n unbekannte/n Rezeptor/en kommt es zu einem schnellen und einem weiteren langanhaltenden $G\alpha_q$ und PLC-vermittelten Calciumeinstrom, die Prozesse des Anheftens und des Reifens des akrosomalen Vesikels bewirken, bevor es dann nach einem Calciumausstrom aus dem Akrosom zu den finalen Prozessen der Bildung der Fusionsporen kommt. [B] Während dieses mehrphasigen Prozesses organisiert das Adapterprotein MUPP1 offenbar Signalmoleküle in einem Proteinkomplex, dessen Funktionseinheiten das Anheften und das Reifen des Vesikels während des Fusionsprozesses vermitteln. Die Komponenten dieses MUPP1-Signalkomplexes sind noch weitestgehend unbekannt, bis auf die CaMKII, die als Interaktionspartner von MUPP1 identifiziert werden konnte. [C] Die CaMKII ist analog zu MUPP1 funktionell an der Akrosomenreaktion beteiligt. Sie verhindert möglicherweise durch das Setzen eines *Clamp*-Signals über die Phosphorylierung eines noch nicht identifizierten Target-Proteins, dass ein spontanes und unbeabsichtigtes Fusionsereignisses in den Spermien stattfindet. Sowohl die CaMKII als auch dessen Phosphorylierungssubstrat könnten über MUPP1 in einem funktionellen Komplex zusammengehalten werden, der allerdings durch eine Erhöhung der Ca/CaM Konzentration in den Spermien und der damit verbundenen Translokation der Kinase wieder aus dem Komplex ins Cytosol gelöst wird. Dadurch wird das Phosphorylierungssubstrat zugänglich für eine noch unbekannte Phosphatase, die durch die Dephosphorylierung des Phosphorylierungspartners (PP) das *Clamp*-Signal löst, so dass die finalen Reaktionen der Akrosomenreaktion ablaufen können.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematischer Aufbau eines Spermiums	4
2.2	Aufgaben eines Spermiums.	8
2.3	Molekulare Prozesse während der Akrosomenreaktion	12
2.4	Molekulare Prozesse der Vesikelfusion	16
2.5	Organisation von <i>lipid rafts</i>	18
2.6	Aufbau des INAD-Signalkomplexes.	20
2.7	Struktureller Aufbau des <i>Multi PDZ domain protein 1</i> MUPP1. . .	21
4.1	Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems	51
4.2	Schematische Darstellung der <i>lipid rafts</i> Aufreinigung mit Hilfe von Triton X-100	59
4.3	Schema Streptolysin O Ansatz	66
4.4	Schematische Darstellung der durch NP-EGTA-AM induzierten Akrosomenreaktion	69
5.1	MUPP1 ist im Bereich des Akrosoms von Spermien lokalisiert. . . .	73
5.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von MUPP1 in Hodengewebe der Maus	75
5.3	Spezifitätsnachweis der verwendeten anti-MUPP1- bzw. anti-Rab3A-Antikörper.	78
5.4	Untersuchungen zur funktionellen Rolle von MUPP1 während der akrosomalen Exocytose	80
5.5	Experimenteller Aufbau der verwendeten Chelator-Strategie. . . .	83
5.6	MUPP1 ist funktionell an den einleitenden Prozessen der Akrosomenreaktion beteiligt	86

5.7	Westernblot Nachweis von Caveolin 1 und MUPP1 in Triton X-100 löslichen und unlöslichen Membrandomänen aus Rattenspermien. . .	89
5.8	Spezifitätsnachweis der Interaktion zwischen dem N-terminalen Bereich von MUPP1 und potentiellen im Hefe-Zwei-Hybrid Screen gefundenen Bindungspartnern.	92
5.9	Nachweis der CaMKII in verschiedenen Gewebeproben mit Hilfe der Westernblot Technik.	95
5.10	Subzelluläre Lokalisation der CaMKII in murinen und humanen Spermien	96
5.11	Die CaMKII ist mit DIGs im Cortex und in Spermien der Ratte assoziiert.	97
5.12	MUPP1 bildet mit der CaMKII α in Hodengewebe einen Komplex. .	100
5.13	Der Calmodulin-Antagonist W7 hat einen potenzierenden Einfluss auf die spontane Akrosomenreaktionsrate in Mausspermien.	102
5.14	Der CamKII Inhibitor KN93 hat einen potenzierenden Einfluss auf die spontane Akrosomenreaktionsrate in Mausspermien.	104
6.1	Hypothetisches Modell zur Funktion von MUPP1 während der Akrosomenreaktion.	114

Literaturverzeichnis

- Aaij, C. and Borst, P. (1972) The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta*, **269**, 192–200.
- Ackermann, F., Zitranski, N., Heydecke, D., Wilhelm, B., Gudermann, T. and Boekhoff, I. (2008) The Multi-PDZ domain protein MUPP1 as a lipid raft-associated scaffolding protein controlling the acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *J Cell Physiol*, **214**, 757–768.
- Allen, J. A., Halverson-Tamboli, R. A. and Rasenick, M. M. (2007) Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci*, **8**, 128–40. 1471-003X (Print) Journal Article Research Support, N.I.H., Extramural Review.
- Andreeva, A. V., Kutuzov, M. A. and Voyno-Yasenetskaya, T. A. (2007) Scaffolding proteins in G-protein signaling. *J Mol Signal*, **2**, 13.
- AUSTIN, C. R. (1952) The capacitation of the mammalian sperm. *Nature*, **170**, 326.
- Avilés, M., Jaber, L., Castells, M. T., Ballesta, J. and Kan, F. W. (1997) Modifications of carbohydrate residues and ZP2 and ZP3 glycoproteins in the mouse zona pellucida after fertilization. *Biol Reprod*, **57**, 1155–1163.
- Bahat, A. and Eisenbach, M. (2006) Sperm thermotaxis. *Mol Cell Endocrinol*, **252**, 115–119.
- Bahat, A., Tur-Kaspa, I., Gakamsky, A., Giojalas, L. C., Breitbart, H. and Eisenbach, M. (2003) Thermotaxis of mammalian sperm cells: a potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nat Med*, **9**, 149–150.

- Bai, J., Earles, C. A., Lewis, J. L. and Chapman, E. R. (2000) Membrane-embedded synaptotagmin penetrates cis or trans target membranes and clusters via a novel mechanism. *J Biol Chem*, **275**, 25427–25435.
- Bai, J., Wang, C.-T., Richards, D. A., Jackson, M. B. and Chapman, E. R. (2004) Fusion pore dynamics are regulated by synaptotagmin**t*-SNARE interactions. *Neuron*, **41**, 929–942.
- Bajpai, M., Fiedler, S. E., Huang, Z., Vijayaraghavan, S., Olson, G. E., Livera, G., Conti, M. and Carr, D. W. (2006) AKAP3 selectively binds PDE4A isoforms in bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, **74**, 109–18. 0006-3363 (Print) Journal Article Research Support, N.I.H., Extramural.
- Barker, L. A., Dowdall, M. J. and Whittaker, V. P. (1972) Choline metabolism in the cerebral cortex of guinea pigs. Stable-bound acetylcholine. *Biochem J*, **130**, 1063–1075.
- Barritt, D. S., Pearn, M. T., Zisch, A. H., Lee, S. S., Javier, R. T., Pasquale, E. B. and Stallcup, W. B. (2000) The multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cytoplasmic ligand for the membrane-spanning proteoglycan NG2. *J Cell Biochem*, **79**, 213–224.
- Becamel, C., Figge, A., Poliak, S., Dumuis, A., Peles, E., Bockaert, J., Lubbert, H. and Ullmer, C. (2001) Interaction of serotonin 5-hydroxytryptamine type 2C receptors with PDZ10 of the multi-PDZ domain protein MUPP1. *J Biol Chem*, **276**, 12974–12982.
- Becherer, U. and Rettig, J. (2006) Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res*, **326**, 393–407.
- Bendahmane, M., Lynch, C. and Tulsiani, D. R. (2001) Calmodulin signals capacitation and triggers the agonist-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Arch Biochem Biophys*, **390**, 1–8.
- Bennett, J. and Scott, K. J. (1971) Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem*, **43**, 173–182.

- Berridge, M. J. (2007) Inositol trisphosphate and calcium oscillations. *Biochem Soc Symp*, pages 1–7.
- Betz, A., Thakur, P., Junge, H. J., Ashery, U., Rhee, J. S., Scheuss, V., Rosenmund, C., Rettig, J. and Brose, N. (2001) Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming. *Neuron*, **30**, 183–96. 0896-6273 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J. and Sziegoleit, A. (1985) Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infect Immun*, **47**, 52–60.
- Bhakdi, S., Weller, U., Walev, I., Martin, E., Jonas, D. and Palmer, M. (1993) A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes. *Med Microbiol Immunol*, **182**, 167–175.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513–1523.
- Blas, G. A. D., Roggero, C. M., Tomes, C. N. and Mayorga, L. S. (2005) Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *PLoS Biol*, **3**, e323.
- Blas, G. D., Michaut, M., Treviño, C. L., Tomes, C. N., Yunes, R., Darszon, A. and Mayorga, L. S. (2002) The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *J Biol Chem*, **277**, 49326–49331.
- Bleil, J. D., Greve, J. M. and Wassarman, P. M. (1988) Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev Biol*, **128**, 376–385.
- Bleil, J. D. and Wassarman, P. M. (1980) Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol*, **76**, 185–202.
- Boerke, A., Tsai, P. S., Garcia-Gil, N., Brewis, I. A. and Gadella, B. M. (2008) Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: Functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology*.

- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248–254.
- Branham, M. T., Mayorga, L. S. and Tomes, C. N. (2006) Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway. *J Biol Chem*, **281**, 8656–66. 0021-9258 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- Bray, D. (1998) Signaling complexes: biophysical constraints on intracellular communication. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **27**, 59–75.
- Breitbart, H. (2002a) Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol*, **187**, 139–44. 0303-7207 (Print) Journal Article Review.
- Breitbart, H. (2002b) Role and regulation of intracellular calcium in acrosomal exocytosis. *J Reprod Immunol*, **53**, 151–159.
- Breitbart, H. (2003) Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **49**, 321–327.
- Brewis, I. A., Moore, H. D., Fraser, L. R., Holt, W. V., Baldi, E., Luconi, M., Gaddella, B. M., Ford, W. C. L. and Harrison, R. A. P. (2005) Molecular mechanisms during sperm capacitation. *Hum Fertil (Camb)*, **8**, 253–261.
- Brose, N., Rosenmund, C. and Rettig, J. (2000) Regulation of transmitter release by Unc-13 and its homologues. *Curr Opin Neurobiol*, **10**, 303–311.
- Brown, D. A. (2006) Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)*, **21**, 430–9. 1548-9213 (Print) Journal Article Research Support, N.I.H., Extramural Review.
- Brunger, A. T. (2001) Structure of proteins involved in synaptic vesicle fusion in neurons. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **30**, 157–171.
- Buck, L. and Axel, R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, **65**, 175–187.

- Bultynck, G., Szlufcik, K., Kasri, N. N., Assefa, Z., Callewaert, G., Missiaen, L., Parys, J. B. and Smedt, H. D. (2004) Thimerosal stimulates Ca^{2+} flux through inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1, but not type 3, via modulation of an isoform-specific Ca^{2+} -dependent intramolecular interaction. *Biochem J*, **381**, 87–96.
- Cai, H., Reinisch, K. and Ferro-Novick, S. (2007) Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell*, **12**, 671–682.
- Cantley, L. C. (2001) Transcription. Translocating tubby. *Science*, **292**, 2019–2021.
- Carreau, S., Lambard, S., Said, L., Saad, A. and Galeraud-Denis, I. (2007) RNA dynamics of fertile and infertile spermatozoa. *Biochem Soc Trans*, **35**, 634–636.
- Carroll, K., Gomez, C. and Shapiro, L. (2004) Tubby proteins: the plot thickens. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 55–63.
- Ceccarelli, B., Hurlbut, W. P. and Mauro, A. (1973) Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol*, **57**, 499–524.
- Chapman, E. R. (2008) How Does Synaptotagmin Trigger Neurotransmitter Release? *Annu Rev Biochem*.
- Cheng, A., Le, T., Palacios, M., Bookbinder, L. H., Wassarman, P. M., Suzuki, F. and Bleil, J. D. (1994) Sperm-egg recognition in the mouse: characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3. *J Cell Biol*, **125**, 867–878.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156–9. 0003-2697 (Print) Journal Article.
- Clark, G. F. and Dell, A. (2006) Molecular models for murine sperm-egg binding. *J Biol Chem*, **281**, 13853–13856.
- Cornwall, G. A., Tulsiani, D. R. and Orgebin-Crist, M. C. (1991) Inhibition of the mouse sperm surface α -D-mannosidase inhibits sperm-egg binding in vitro. *Biol Reprod*, **44**, 913–921.

- Correia, J. N., Conner, S. J. and Kirkman-Brown, J. C. (2007) Non-genomic steroid actions in human spermatozoa. Persistent tickling from a laden environment. *Semin Reprod Med*, **25**, 208–219.
- Cross, N. L. (2004) Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biol Reprod*, **71**, 1367–73. 0006-3363 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- Darszon, A., Acevedo, J. J., Galindo, B. E., Hernandez-Gonzalez, E. O., Nishigaki, T., Trevino, C. L., Wood, C. and Beltran, C. (2006) Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction*, **131**, 977–88. 1470-1626 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Review.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Wood, C., Treviño, C. L., Felix, R. and Beltrán, C. (2005) Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol*, **243**, 79–172.
- Davis, A. F., Bai, J., Fasshauer, D., Wolowick, M. J., Lewis, J. L. and Chapman, E. R. (1999) Kinetics of synaptotagmin responses to Ca²⁺ and assembly with the core SNARE complex onto membranes. *Neuron*, **24**, 363–376.
- Davletov, B. A. and Südhof, T. C. (1993) A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca²⁺/phospholipid binding. *J Biol Chem*, **268**, 26386–26390.
- Delgado-Buenrostro, N. L., Hernandez-Gonzalez, E. O., Segura-Nieto, M. and Mujica, A. (2005) Actin polymerization in the equatorial and postacrosomal regions of guinea pig spermatozoa during the acrosome reaction is regulated by G proteins. *Mol Reprod Dev*, **70**, 198–210. 1040-452X (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- Desai, R. C., Vyas, B., Earles, C. A., Littleton, J. T., Kowalchuck, J. A., Martin, T. F. and Chapman, E. R. (2000) The C2B domain of synaptotagmin is a Ca(2+)-sensing module essential for exocytosis. *J Cell Biol*, **150**, 1125–1136.
- Dong, H., Zhang, P., Song, I., Petralia, R. S., Liao, D. and Huganir, R. L. (1999) Characterization of the glutamate receptor-interacting proteins GRIP1

- and GRIP2. *J Neurosci*, **19**, 6930–41. 1529-2401 (Electronic) Journal Article
Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- Du, F., Saitoh, F., Tian, Q.-B., Miyazawa, S., Endo, S. and Suzuki, T. (2006)
Mechanisms for association of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II
with lipid rafts. *Biochem Biophys Res Commun*, **347**, 814–820.
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Südhof, T. C. and
Rizo, J. (1999) A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of
munc18. *EMBO J*, **18**, 4372–4382.
- Eisenbach, M. and Giojalas, L. C. (2006) Sperm guidance in mammals - an unpaved
road to the egg. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 276–285.
- Eisenbach, M. and Tur-Kaspa, I. (1999) Do human eggs attract spermatozoa?
Bioessays, **21**, 203–210.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T.
(2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured
mammalian cells. *Nature*, **411**, 494–498.
- Fang, Y., Macool, D. J., Xue, Z., Heppard, E. P., Hainey, C. F., Tingey, S. V.
and Miao, G.-H. (2002) Development of a high-throughput yeast two-hybrid
screening system to study protein-protein interactions in plants. *Mol Genet
Genomics*, **267**, 142–153.
- Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein
interactions. *Nature*, **340**, 245–246.
- Fink, C. C. and Meyer, T. (2002) Molecular mechanisms of CaMKII activation in
neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, **12**, 293–299.
- Florman, H. M., Jungnickel, M. K. and Sutton, K. A. (2008) Regulating the acro-
some reaction. *Int J Dev Biol*, **52**, 503–510.
- Foley, K. P., Leonard, M. W. and Engel, J. D. (1993) Quantitation of RNA using
the polymerase chain reaction. *Trends Genet*, **9**, 380–5. 0168-9525 (Print) Jour-

- nal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review.
- Fukami, K., Nakao, K., Inoue, T., Kataoka, Y., Kurokawa, M., Fissore, R. A., Nakamura, K., Katsuki, M., Mikoshiba, K., Yoshida, N. and Takenawa, T. (2001) Requirement of phospholipase Cdelta4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Science*, **292**, 920–3. 0036-8075 (Print) Journal Article.
- Fukami, K., Yoshida, M., Inoue, T., Kurokawa, M., Fissore, R. A., Yoshida, N., Mikoshiba, K. and Takenawa, T. (2003) Phospholipase Cdelta4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J Cell Biol*, **161**, 79–88. 0021-9525 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- Fukuda, N., Yomogida, K., Okabe, M. and Touhara, K. (2004) Functional characterization of a mouse testicular olfactory receptor and its role in chemosensing and in regulation of sperm motility. *J Cell Sci*, **117**, 5835–5845.
- Gao, Z. and Garbers, D. L. (1998) Species diversity in the structure of zonadhesin, a sperm-specific membrane protein containing multiple cell adhesion molecule-like domains. *J Biol Chem*, **273**, 3415–3421.
- Gómez-Moutón, C., Lacalle, R. A., Mira, E., Jiménez-Baranda, S., Barber, D. F., Carrera, A. C., Martínez-A, C. and Mañes, S. (2004) Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. *J Cell Biol*, **164**, 759–768.
- Golub, T., Wacha, S. and Caroni, P. (2004) Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts. *Curr Opin Neurobiol*, **14**, 542–550.
- Greve, J. M. and Wassarman, P. M. (1985) Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J Mol Biol*, **181**, 253–264.
- Griffith, L. C. (2004a) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: an unforgettable kinase. *J Neurosci*, **24**, 8391–8393.

- Griffith, L. C. (2004b) Regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation by intramolecular and intermolecular interactions. *J Neurosci*, **24**, 8394–8398.
- Grosshans, B. L., Ortiz, D. and Novick, P. (2006) Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11821–7. 0027-8424 (Print) Journal Article Review.
- Guillaume, J.-L., Daulat, A. M., Maurice, P., Levoye, A., Migaud, M., Brydon, L., Malpaux, B., Borg-Capra, C. and Jockers, R. (2008) The PDZ protein MUPP1 promotes Gi coupling and signalling of the MT1 melatonin receptor. *J Biol Chem*.
- Gulyás-Kovács, A., de Wit, H., Milosevic, I., Kochubey, O., Toonen, R., Klingauf, J., Verhage, M. and Sørensen, J. B. (2007) Munc18-1: sequential interactions with the fusion machinery stimulate vesicle docking and priming. *J Neurosci*, **27**, 8676–8686.
- Guo, W., Tamanoi, F. and Novick, P. (2001) Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat Cell Biol*, **3**, 353–360.
- Gupta, S. K., Chakravarty, S., Suraj, K., Bansal, P., Ganguly, A., Jain, M. K. and Bhandari, B. (2007) Structural and functional attributes of zona pellucida glycoproteins. *Soc Reprod Fertil Suppl*, **63**, 203–216.
- Hall, Z. W. and Sanes, J. R. (1993) Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell*, **72 Suppl**, 99–121.
- Hamazaki, Y., Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M. and Tsukita, S. (2002) Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem*, **277**, 455–461.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557–580.
- Harris, B. Z. and Lim, W. A. (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci*, **114**, 3219–3231.

- Harrison, R. A. and Miller, N. G. (2000) cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Mol Reprod Dev*, **55**, 220–228.
- Hata, Y., Slaughter, C. A. and Südhof, T. C. (1993) Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature*, **366**, 347–351.
- Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Südhof, T. C. and Niemann, H. (1994) Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J*, **13**, 5051–5061.
- Hedgpeth, J., Goodman, H. M. and Boyer, H. W. (1972) DNA nucleotide sequence restricted by the RI endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 3448–3452.
- Helms, J. B. and Zurzolo, C. (2004) Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic*, **5**, 247–254.
- Herrick, S. B., Schweissinger, D. L., Kim, S.-W., Bayan, K. R., Mann, S. and Cardullo, R. A. (2005) The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J Cell Physiol*, **202**, 663–671.
- Heuser, J. E. and Reese, T. S. (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol*, **57**, 315–344.
- Heydecke, D., Meyer, D., Ackermann, F., Wilhelm, B., Gudermann, T. and Boekhoff, I. (2006) The multi PDZ domain protein MUPP1 as a putative scaffolding protein for organizing signaling complexes in the acrosome of mammalian spermatozoa. *J Androl*, **27**, 390–404.
- Hidaka, H., Sasaki, Y., Tanaka, T., Endo, T., Ohno, S., Fujii, Y. and Nagata, T. (1981) N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 4354–4357.
- Hoffman, C. S. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267–272.

- Huber, A. (2001) Scaffolding proteins organize multimolecular protein complexes for sensory signal transduction. *Eur J Neurosci*, **14**, 769–776.
- Hudmon, A. and Schulman, H. (2002) Neuronal CA2+/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem*, **71**, 473–510.
- Hung, A. Y. and Sheng, M. (2002) PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem*, **277**, 5699–5702.
- Ignotz, G. G. and Suarez, S. S. (2005) Calcium/calmodulin and calmodulin kinase II stimulate hyperactivation in demembranated bovine sperm. *Biol Reprod*, **73**, 519–526.
- Iida, H., Yoshinaga, Y., Tanaka, S., Toshimori, K. and Mori, T. (1999) Identification of Rab3A GTPase as an acrosome-associated small GTP-binding protein in rat sperm. *Dev Biol*, **211**, 144–155.
- Ikeda, A., Nishina, P. M. and Naggert, J. K. (2002) The tubby-like proteins, a family with roles in neuronal development and function. *J Cell Sci*, **115**, 9–14.
- Inaba, K. (2003) Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoolog Sci*, **20**, 1043–1056.
- Inaba, K. (2007) Molecular basis of sperm flagellar axonemes: structural and evolutionary aspects. *Ann N Y Acad Sci*, **1101**, 506–526.
- Irie, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., Takai, Y., Rosahl, T. W. and Südhof, T. C. (1997) Binding of neuroligins to PSD-95. *Science*, **277**, 1511–1515.
- Irino, Y., Ichinohe, M., Nakamura, Y., Nakahara, M. and Fukami, K. (2005) Phospholipase Cdelta4 associates with glutamate receptor interacting protein 1 in testis. *J Biochem*, **138**, 451–456.
- Isobe, T., Minoura, H., Tanaka, K., Shibahara, T., Hayashi, N. and Toyoda, N. (2002) The effect of RANTES on human sperm chemotaxis. *Hum Reprod*, **17**, 1441–1446.

- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, **153**, 163–168.
- Iwabuchi, K., Handa, K. and Hakomori, S. (1998) Separation of 'glycosphingolipid signaling domain' from caveolin-containing membrane fraction in mouse melanoma B16 cells and its role in cell adhesion coupled with signaling. *J Biol Chem*, **273**, 33766–33773.
- Jahn, R. (2004) Principles of exocytosis and membrane fusion. *Ann N Y Acad Sci*, **1014**, 170–178.
- Jahn, R., Lang, T. and Südhof, T. C. (2003) Membrane fusion. *Cell*, **112**, 519–533.
- Jahn, R. and Südhof, T. C. (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem*, **68**, 863–911.
- Jan, C. R., Yu, C. C. and Huang, J. K. (2000) N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride (W-7) causes increases in intracellular free Ca²⁺ levels in bladder female transitional carcinoma (BFTC) cells. *Anti-cancer Res*, **20**, 4355–4359.
- Jelen, F., Oleksy, A., Smietana, K. and Otlewski, J. (2003) PDZ domains - common players in the cell signaling. *Acta Biochim Pol*, **50**, 985–1017.
- Jemth, P. and Gianni, S. (2007) PDZ domains: folding and binding. *Biochemistry*, **46**, 8701–8708.
- Jha, K. N., Kameshwari, D. B. and Shivaji, S. (2003) Role of signaling pathways in regulating the capacitation of mammalian spermatozoa. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **49**, 329–340.
- Johnston, P. A., Archer, B. T., Robinson, K., Mignery, G. A., Jahn, R. and Südhof, T. C. (1991) rab3A attachment to the synaptic vesicle membrane mediated by a conserved polyisoprenylated carboxy-terminal sequence. *Neuron*, **7**, 101–109.
- Jungnickel, M. K., Marrero, H., Birnbaumer, L., Lemos, J. R. and Florman, H. M. (2001) Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol*, **3**, 499–502.

- Kaelin, W. G., Pallas, D. C., DeCaprio, J. A., Kaye, F. J. and Livingston, D. M. (1991) Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell*, **64**, 521–532.
- Katafuchi, K., Mori, T., Toshimori, K. and Iida, H. (2000) Localization of a syntaxin isoform, syntaxin 2, to the acrosomal region of rodent spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, **57**, 375–83. 1040-452X (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- Kierszenbaum, A. L. and Tres, L. L. (2004) The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol*, **67**, 271–284.
- Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., Jan, Y. N. and Sheng, M. (1995) Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature*, **378**, 85–88.
- Kim, E. and Sheng, M. (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 771–781.
- Kim, J. H., Liao, D., Lau, L. F. and Huganir, R. L. (1998) SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron*, **20**, 683–691.
- Kimber, W. A., Trinkle-Mulcahy, L., Cheung, P. C. F., Deak, M., Marsden, L. J., Kieloch, A., Watt, S., Javier, R. T., Gray, A., Downes, C. P., Lucocq, J. M. and Alessi, D. R. (2002) Evidence that the tandem-pleckstrin-homology-domain-containing protein TAPP1 interacts with Ptd(3,4)P₂ and the multi-PDZ-domain-containing protein MUPP1 in vivo. *Biochem J*, **361**, 525–536.
- Klenchin, V. A. and Martin, T. F. (2000) Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking. *Biochimie*, **82**, 399–407.
- Kümmel, D. and Heinemann, U. (2008) Diversity in structure and function of tethering complexes: evidence for different mechanisms in vesicular transport regulation. *Curr Protein Pept Sci*, **9**, 197–209.

- Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B. and Seeburg, P. H. (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, **269**, 1737–1740.
- Krapivinsky, G., Medina, I., Krapivinsky, L., Gapon, S. and Clapham, D. E. (2004) SynGAP-MUPP1-CaMKII synaptic complexes regulate p38 MAP kinase activity and NMDA receptor-dependent synaptic AMPA receptor potentiation. *Neuron*, **43**, 563–574.
- Kurzchalia, T. V. and Parton, R. G. (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 424–431.
- Kusumi, A. and Sako, Y. (1996) Cell surface organization by the membrane skeleton. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 566–574.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Lang, T. (2007) SNARE proteins and 'membrane rafts'. *J Physiol*, **585**, 693–698.
- Lang, T. and Jahn, R. (2008) Core proteins of the secretory machinery. *Handb Exp Pharmacol*, pages 107–127.
- Latorre, R., Brauchi, S., Orta, G., Zaelzer, C. and Vargas, G. (2007) ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium*, **42**, 427–438.
- Lee, S. S., Glaunsinger, B., Mantovani, F., Banks, L. and Javier, R. T. (2000) Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J Virol*, **74**, 9680–9693.
- Lehman, I. R. (1974) DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science*, **186**, 790–797.
- Li, H. S. and Montell, C. (2000) TRP and the PDZ protein, INAD, form the core complex required for retention of the signalplex in *Drosophila* photoreceptor cells. *J Cell Biol*, **150**, 1411–1422.

- Li, Q. Z., Wang, C. Y., Shi, J. D., Ruan, Q. G., Eckenrode, S., Davoodi-Semiromi, A., Kukar, T., Gu, Y., Lian, W., Wu, D. and She, J. X. (2001) Molecular cloning and characterization of the mouse and human TUSP gene, a novel member of the tubby superfamily. *Gene*, **273**, 275–284.
- Lisanti, M. P., Tang, Z., Scherer, P. E. and Sargiacomo, M. (1995) Caveolae purification and glycosylphosphatidylinositol-linked protein sorting in polarized epithelia. *Methods Enzymol*, **250**, 655–668.
- Liu, D. Y. and Baker, H. W. G. (2004) High frequency of defective sperm-zona pellucida interaction in oligozoospermic infertile men. *Hum Reprod*, **19**, 228–233.
- Lopez, L. C., Bayna, E. M., Litoff, D., Shaper, N. L., Shaper, J. H. and Shur, B. D. (1985) Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. *J Cell Biol*, **101**, 1501–1510.
- López-González, I., Vega-Beltrán, J. L. D. L., Santi, C. M., Florman, H. M., Felix, R. and Darszon, A. (2001) Calmodulin antagonists inhibit T-type Ca(2+) currents in mouse spermatogenic cells and the zona pellucida-induced sperm acrosome reaction. *Dev Biol*, **236**, 210–219.
- Lu, H.-Y., Lu, J.-C., Hu, Y.-A., Wang, Y.-M. and Huang, Y.-F. (2002) [Detection of human sperm morphology and acrosome reaction with Coomassie brilliant blue staining]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, **8**, 204–206.
- Luo, F., Yang, C., Chen, Y., Shukla, P., Tang, L., Wang, L. X. and Wang, Z. J. (2008) Reversal of chronic inflammatory pain by acute inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Pharmacol Exp Ther*, **325**, 267–275.
- Mandel, M. and Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, **53**, 159–162.
- Marley, P. D. and Thomson, K. A. (1996) The Ca⁺⁺/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitors KN62 and KN93, and their inactive analogues KN04 and KN92, inhibit nicotinic activation of tyrosine hydroxylase in bovine chromaffin cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **221**, 15–18.

- Martens, S. and McMahon, H. T. (2008) Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 543–556.
- Marz, K. E. and Hanson, P. I. (2002) Sealed with a twist: complexin and the synaptic SNARE complex. *Trends Neurosci*, **25**, 381–383.
- Mayorga, L. S., Tomes, C. N. and Belmonte, S. A. (2007) Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life*, **59**, 286–292.
- McDonell, M. W., Simon, M. N. and Studier, F. W. (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol*, **110**, 119–46. 0022-2836 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- Melia, T. J. (2007) Putting the clamps on membrane fusion: how complexin sets the stage for calcium-mediated exocytosis. *FEBS Lett*, **581**, 2131–2139.
- Michaut, M., Blas, G. D., Tomes, C. N., Yunes, R., Fukuda, M. and Mayorga, L. S. (2001) Synaptotagmin VI participates in the acrosome reaction of human spermatozoa. *Dev Biol*, **235**, 521–529.
- Michaut, M., Tomes, C. N., Blas, G. D., Yunes, R. and Mayorga, L. S. (2000) Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9996–10001.
- Mishra, S. and Joshi, P. G. (2007) Lipid raft heterogeneity: an enigma. *J Neurochem*, **103 Suppl 1**, 135–142.
- Misra, C. and Ziff, E. B. (2005) EphB2 gets a GRIP on the dendritic arbor. *Nat Neurosci*, **8**, 848–850.
- Muciaccia, B., Padula, F., Vicini, E., Gandini, L., Lenzi, A. and Stefanini, M. (2005) Beta-chemokine receptors 5 and 3 are expressed on the head region of human spermatozoon. *FASEB J*, **19**, 2048–2050.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold*

- Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263–73. 0091-7451 (Print) Journal Article.
- Niu, S.-L., Mitchell, D. C. and Litman, B. J. (2002) Manipulation of cholesterol levels in rod disk membranes by methyl-beta-cyclodextrin: effects on receptor activation. *J Biol Chem*, **277**, 20139–20145.
- Nourry, C., Grant, S. G. N. and Borg, J.-P. (2003) PDZ domain proteins: plug and play! *Sci STKE*, **2003**, RE7.
- Oishi, M. and Cosloy, S. D. (1972) The genetic and biochemical basis of the transformability of *Escherichia coli* K12. *Biochem Biophys Res Commun*, **49**, 1568–1572.
- Okamoto, M. and Südhof, T. C. (1997) Mints, Munc18-interacting proteins in synaptic vesicle exocytosis. *J Biol Chem*, **272**, 31459–31464.
- Oren-Benaroya, R., Orvieto, R., Gakamsky, A., Pinchasov, M. and Eisenbach, M. (2008) The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Hum Reprod*.
- Ostrom, R. S. and Liu, X. (2007) Detergent and detergent-free methods to define lipid rafts and caveolae. *Methods Mol Biol*, **400**, 459–468.
- Parker, L. L., Backstrom, J. R., Sanders-Bush, E. and Shieh, B.-H. (2003) Agonist-induced phosphorylation of the serotonin 5-HT_{2C} receptor regulates its interaction with multiple PDZ protein 1. *J Biol Chem*, **278**, 21576–21583.
- Parton, R. G. and Simons, K. (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 185–194.
- Patapoutian, A. (2005) TRP channels and thermosensation. *Chem Senses*, **30 Suppl 1**, i193–i194.
- Patel, H. H., Murray, F. and Insel, P. A. (2008a) Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **48**, 359–391.

- Patel, H. H., Murray, F. and Insel, P. A. (2008b) G-protein-coupled receptor-signaling components in membrane raft and caveolae microdomains. *Handb Exp Pharmacol*, pages 167–184.
- Penzes, P., Johnson, R. C., Sattler, R., Zhang, X., Huganir, R. L., Kambampati, V., Mains, R. E. and Eipper, B. A. (2001) The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis. *Neuron*, **29**, 229–242.
- Perin, M. S., Brose, N., Jahn, R. and Südhof, T. C. (1991) Domain structure of synaptotagmin (p65). *J Biol Chem*, **266**, 623–629.
- Pesch, S. and Bergmann, M. (2006) Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, **37**, 597–612.
- Ramalho-Santos, J., Moreno, R. D., Sutovsky, P., Chan, A. W., Hewitson, L., Wessel, G. M., Simerly, C. R. and Schatten, G. (2000) SNAREs in mammalian sperm: possible implications for fertilization. *Dev Biol*, **223**, 54–69.
- Rathi, R., Colenbrander, B., Bevers, M. M. and Gadella, B. M. (2001) Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod*, **65**, 462–470.
- Rodeheffer, C. and Shur, B. D. (2004) Characterization of a novel ZP3-independent sperm-binding ligand that facilitates sperm adhesion to the egg coat. *Development*, **131**, 503–512.
- Rodriguez-Martinez, H., Ekstedt, E. and Einarsson, S. (1990) Acidification of epididymal fluid in the boar. *Int J Androl*, **13**, 238–243.
- Rosenmund, C., Rettig, J. and Brose, N. (2003) Molecular mechanisms of active zone function. *Curr Opin Neurobiol*, **13**, 509–519.
- Rothman, J. E. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, **372**, 55–63.
- Salicioni, A. M., Platt, M. D., Wertheimer, E. V., Arcelay, E., Allaire, A., Sosnik, J. and Visconti, P. E. (2007) Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl*, **65**, 245–259.

- Sassa, T., Harada, S., Ogawa, H., Rand, J. B., Maruyama, I. N. and Hosono, R. (1999) Regulation of the UNC-18-Caenorhabditis elegans syntaxin complex by UNC-13. *J Neurosci*, **19**, 4772–4777.
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., de Laureto, P. P., DasGupta, B. R. and Montecucco, C. (1992) Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*, **359**, 832–835.
- Schiavo, G., Matteoli, M. and Montecucco, C. (2000) Neurotoxins affecting neuro-exocytosis. *Physiol Rev*, **80**, 717–766.
- Schiestl, R. H. and Gietz, R. D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet*, **16**, 339–346.
- Schlingmann, K., Michaut, M. A., McElwee, J. L., Wolff, C. A., Travis, A. J. and Turner, R. M. (2007) Calmodulin and CaMKII in the sperm principal piece: evidence for a motility-related calcium/calmodulin pathway. *J Androl*, **28**, 706–716.
- Schoch, S. and Gundelfinger, E. D. (2006) Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res*, **326**, 379–91. 0302-766X (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Review.
- Sena, E. P., Radin, D. N., Welch, J. and Fogel, S. (1975) Synchronous mating in yeasts. *Methods Cell Biol*, **11**, 71–88.
- Shadan, S., James, P. S., Howes, E. A. and Jones, R. (2004) Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biol Reprod*, **71**, 253–65. 0006-3363 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- Sheng, M. and Pak, D. T. (1999) Glutamate receptor anchoring proteins and the molecular organization of excitatory synapses. *Ann N Y Acad Sci*, **868**, 483–493.

- Sheng, M. and Sala, C. (2001) PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 1–29. 0147-006X (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review.
- Shieh, B. H. and Zhu, M. Y. (1996) Regulation of the TRP Ca²⁺ channel by INAD in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*, **16**, 991–998.
- Shuman, S. (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem*, **269**, 32678–32684.
- Shur, B. D. and Hall, N. G. (1982) A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *J Cell Biol*, **95**, 574–579.
- Silverman, J. B., Restituto, S., Lu, W., Lee-Edwards, L., Khatri, L. and Ziff, E. B. (2007) Synaptic anchorage of AMPA receptors by cadherins through neural plakophilin-related arm protein AMPA receptor-binding protein complexes. *J Neurosci*, **27**, 8505–8516.
- Simon, M. N., Virgilio, C. D., Souza, B., Pringle, J. R., Abo, A. and Reed, S. I. (1995) Role for the Rho-family GTPase Cdc42 in yeast mating-pheromone signal pathway. *Nature*, **376**, 702–705.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569–572.
- Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 31–9. 1471-0072 (Print) Journal Article Review.
- Simons, K. and van Meer, G. (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, **27**, 6197–6202.
- Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720–731.
- Sitek, B., Poschmann, G., Schmidtke, K., Ullmer, C., Maskri, L., Andriske, M., Stichel, C. C., Zhu, X.-R. and Luebbert, H. (2003) Expression of MUPP1 protein in mouse brain. *Brain Res*, **970**, 178–187.

- Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H. and Rothman, J. E. (1993) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, **75**, 409–418.
- Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, **67**, 31–40.
- Sornarajah, L., Vasuta, O. C., Zhang, L., Sutton, C., Li, B., El-Husseini, A. and Raymond, L. A. (2008) NMDA receptor desensitization regulated by direct binding to PDZ1-2 domains of PSD-95. *J Neurophysiol*, **99**, 3052–3062.
- Spehr, M., Gisselmann, G., Poplawski, A., Riffell, J. A., Wetzel, C. H., Zimmer, R. K. and Hatt, H. (2003) Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science*, **299**, 2054–2058.
- Sudhof, T. C. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*, **27**, 509–547.
- Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J. and Frenette, G. (2005) Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis*, **35**, 1–10.
- Sutton, K. A., Jungnickel, M. K., Wang, Y., Cullen, K., Lambert, S. and Florman, H. M. (2004) Enkurin is a novel calmodulin and TRPC channel binding protein in sperm. *Dev Biol*, **274**, 426–35. 0012-1606 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- Suznovich, C. T., Pu, R. and Bieber, A. J. (2007) CaM kinase II isoforms are expressed at lower levels in brains of shiverer mutants. *J Mol Neurosci*, **31**, 297–305.
- Suzuki, T., Du, F., Tian, Q.-B., Zhang, J. and Endo, S. (2008) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II α clusters are associated with stable lipid rafts and their formation traps PSD-95. *J Neurochem*, **104**, 596–610.
- Tcherkezian, J. and Lamarche-Vane, N. (2007) Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell*, **99**, 67–86.

- Thaler, C. D., Thomas, M. and Ramalie, J. R. (2006) Reorganization of mouse sperm lipid rafts by capacitation. *Mol Reprod Dev*, **73**, 1541–9. 1040-452X (Print) Journal Article Research Support, N.I.H., Extramural.
- Thastrup, O., Dawson, A. P., Scharff, O., Foder, B., Cullen, P. J., Drøbak, B. K., Bjerrum, P. J., Christensen, S. B. and Hanley, M. R. (1989) Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions*, **27**, 17–23.
- Tochio, H., Mok, Y. K., Zhang, Q., Kan, H. M., Bredt, D. S. and Zhang, M. (2000) Formation of nNOS/PSD-95 PDZ dimer requires a preformed beta-finger structure from the nNOS PDZ domain. *J Mol Biol*, **303**, 359–370.
- Tomes, C. N. (2007) Molecular mechanisms of membrane fusion during acrosomal exocytosis. *Soc Reprod Fertil Suppl*, **65**, 275–291.
- Tomes, C. N., Blas, G. A. D., Michaut, M. A., Farré, E. V., Cherhitin, O., Visconti, P. E. and Mayorga, L. S. (2005) alpha-SNAP and NSF are required in a priming step during the human sperm acrosome reaction. *Mol Hum Reprod*, **11**, 43–51.
- Tomes, C. N., Michaut, M., Blas, G. D., Visconti, P., Matti, U. and Mayorga, L. S. (2002) SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction. *Dev Biol*, **243**, 326–338.
- Tomita, S., Nicoll, R. A. and Bredt, D. S. (2001) PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity. *J Cell Biol*, **153**, F19–F24.
- Toonen, R. F. G. (2003) Role of Munc18-1 in synaptic vesicle and large dense-core vesicle secretion. *Biochem Soc Trans*, **31**, 848–850.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350–4354.
- Travis, A. J., Merdushev, T., Vargas, L. A., Jones, B. H., Purdon, M. A., Nipper, R. W., Galatioto, J., Moss, S. B., Hunnicutt, G. R. and Kopf, G. S. (2001) Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts,

- in mouse and Guinea pig spermatozoa. *Dev Biol*, **240**, 599–610. 0012-1606 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- Trevino, C. L., Serrano, C. J., Beltran, C., Felix, R. and Darszon, A. (2001) Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm. *FEBS Lett*, **509**, 119–25. 0014-5793 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- Tsai, P.-S., Vries, K. J. D., Boer-Brouwer, M. D., Garcia-Gil, N., Gestel, R. A. V., Colenbrander, B., Gadella, B. M. and Haeflten, T. V. (2007) Syntaxin and VAMP association with lipid rafts depends on cholesterol depletion in capacitating sperm cells. *Mol Membr Biol*, **24**, 313–324.
- Tsunoda, S., Sierralta, J., Sun, Y., Bodner, R., Suzuki, E., Becker, A., Socolich, M. and Zuker, C. S. (1997) A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature*, **388**, 243–249.
- Tsunoda, S., Sun, Y., Suzuki, E. and Zuker, C. (2001) Independent anchoring and assembly mechanisms of INAD signaling complexes in *Drosophila* photoreceptors. *J Neurosci*, **21**, 150–158.
- Tulsiani, D. R., Abou-Haila, A., Loeser, C. R. and Pereira, B. M. (1998) The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res*, **240**, 151–164.
- Tüzün, Y., Antonov, M., Dolar, N. and Wolf, R. (2007) Keratinocyte cytokine and chemokine receptors. *Dermatol Clin*, **25**, 467–76, vii.
- Ullmer, C., Schmuck, K., Figge, A. and Lubbert, H. (1998) Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein. *FEBS Lett*, **424**, 63–8. 0014-5793 (Print) Journal Article.
- van Gestel, R. A., Brewis, I. A., Ashton, P. R., Helms, J. B., Brouwers, J. F. and Gadella, B. M. (2005) Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Mol Hum Reprod*, **11**, 583–90. 1360-9947 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.

- Vazquez, M. H., Phillips, D. M. and Wassarman, P. M. (1989) Interaction of mouse sperm with purified sperm receptors covalently linked to silica beads. *J Cell Sci*, **92** (Pt 4), 713–722.
- Verhage, M., de Vries, K. J., Røshol, H., Burbach, J. P., Gispen, W. H. and Südhof, T. C. (1997) DOC2 proteins in rat brain: complementary distribution and proposed function as vesicular adapter proteins in early stages of secretion. *Neuron*, **18**, 453–461.
- Walensky, L. D. and Snyder, S. H. (1995) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J Cell Biol*, **130**, 857–869.
- Wang, X., Hu, B., Zimmermann, B. and Kilimann, M. W. (2001) Rim1 and rabphilin-3 bind Rab3-GTP by composite determinants partially related through N-terminal alpha -helix motifs. *J Biol Chem*, **276**, 32480–32488.
- Wassarman, P. M., Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Darie, C. and Litscher, E. S. (2005) Recent aspects of mammalian fertilization research. *Mol Cell Endocrinol*, **234**, 95–103.
- Whyte, J. R. C. and Munro, S. (2002) Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J Cell Sci*, **115**, 2627–2637.
- Yamauchi, T. (2005) Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II—discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory. *Biol Pharm Bull*, **28**, 1342–1354.
- Yanagimachi, R. (1994) Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, **2**, 371–372.
- Yunes, R., Michaut, M., Tomes, C. and Mayorga, L. S. (2000) Rab3A triggers the acrosome reaction in permeabilized human spermatozoa. *Biol Reprod*, **62**, 1084–1089.
- Yunes, R., Tomes, C., Michaut, M., Blas, G. D., Rodriguez, F., Regazzi, R. and Mayorga, L. S. (2002) Rab3A and calmodulin regulate acrosomal exocytosis by mechanisms that do not require a direct interaction. *FEBS Lett*, **525**, 126–130.

- Zeng, H.-T. and Tulsiani, D. R. P. (2003) Calmodulin antagonists differentially affect capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation of mouse sperm components. *J Cell Sci*, **116**, 1981–1989.
- Zhang, X., Orlando, K., He, B., Xi, F., Zhang, J., Zajac, A. and Guo, W. (2008) Membrane association and functional regulation of Sec3 by phospholipids and Cdc42. *J Cell Biol*, **180**, 145–158.

A Abkürzungen

Abb	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calcium/Calmodulin abhängige Protein-kinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DIG	<i>detergent-insoluble glycolipid membrane complexes</i>
Dlg	<i>disc large</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease

A Abkürzungen

DRM	<i>detergent resistant membrane</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Epac	<i>exchange protein directly activated by cAMP</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
INAD	<i>Inactivation No-After Potential</i>
IgG	Immunoglobuline G
IP ₃	Inositoltrisphosphat
K	Kalium
LB	<i>Luria Broth</i>
Li	Lithium
m	mili
M	Molar
mg	Miligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
ms	Millisekunde
MUPP μ	micro
n	nano
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein</i>

A Abkürzungen

NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDZ	<i>postsynaptic protein PSD95, Drosophila junction protein disc-large, tight junction protein ZO-1</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PIP2	Phosphatidylinositolbiphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKK	Proteinkinase K
PLC	Phospholipase C
PSD	<i>post synaptic density</i>
Rantes	<i>regulated upon activation normal T cell expressed and secreted</i>
RIM	<i>Rab molecule interacting protein</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
SNAP	<i>membrane-associated soluble NSF attachment protein</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
SOC	<i>store operated calcium entry</i>
SynGAP	<i>synaptic GTPase activating protein</i>
TAE	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TAPP	<i>tandem pleckstrin homology domain protein</i>
TRP	<i>transient receptor potential</i>

A Abkürzungen

u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
VAMP	Synaptobrevin
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
ZP	zona pellucida
ZO-1	<i>zona occludins protein</i>
z. T.	zum Teil
z. Z.	zur Zeit

B Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Thomas Gudermann dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat am Institut für Pharmakologie und Toxikologie meine Doktorarbeit anzufertigen.

Einen besonders großen Dank möchte ich an meine Betreuerin PD Dr. Ingrid Boekhoff richten. Vielen Dank für die großartige Unterstützung und die vielen fruchtbaren Diskussionen. Durch unsere Zusammenarbeit habe ich sehr viel gelernt und immer die Freude an der Forschung behalten.

Bei Frau Dr. Beate Wilhelm möchte ich mich für die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Analysen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Marga Losekam für ihre technische Hilfe, ohne ihren großen Einsatz wäre vieles nicht möglich gewesen. Ich danke auch allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie für ihre Hilfe und das gute Arbeitsklima.

Ein besonderer Dank gilt Hermann Kalwa, der immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Wünsche hatte, und durch seine Geschichten und Sichtweisen für so manch lustige Stunde im Labor gesorgt hat.

Ganz besonders möchte ich meinen „Mädels“ Heike Borth, Nele Zitranski und Dorke Meyer danken: Vielen Vielen Dank für eure Unterstützung und die super Stimmung im Labor, ihr seid die Besten Kolleginnen die man sich wünschen kann. Dorke: Danke für die vielen super leckeren Kuchen, die uns so oft die Kaffeepause versüßt habe. Ich habe immer sehr gerne mit euch zusammengearbeitet und werde euch sehr vermissen, ich wünsche euch ganz viel Erfolg in München!

Ganz besonders möchte ich mich nochmal bei Heike Borth bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mich in schweren Zeiten immer wieder aufgebaut hat. Vielen, Vielen Dank !!

Außerdem möchte ich mich bei Kay Schink für die endlosen wissenschaftlichen

Diskussionen und dafür bedanken, dass er mich einen großen Teil meines Lebens begleitet und immer an mich geglaubt hat.

Ein sehr großer Dank gilt meiner Familie. Danke Ilka, dass du immer für mich da bist und ich bei Dir und Kay immer einen Unterschlupf finden konnte. Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die immer für mich da waren, mich in Allem unterstützt und immer an mich geglaubt haben, ohne euch wäre vieles nicht möglich gewesen ! Vielen, vielen Dank !

C Lebenslauf

Name	Ackermann, Frauke
geboren	26.11.1979
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Adresse	Zeppelinstrasse 2 35039 Marburg

Schulbildung

08.1992 - 07.1999	Einhardschule, Seligenstadt Abschluss: Abitur
-------------------	--

Studium

10.1999 - 08.2004	Biologiestudium an der Philipps Universität Marburg
10.2003	Diplomprüfung
11.2003 - 08.2004	Diplomarbeit am Fachbereich Biologie - Neurobiologie/Ethologie
11.2004 - 08.2008	Doktorarbeit am Fachbereich Biologie - Pharmakologie

D Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich Frauke Ackermann, geboren am 26.11.1979 in Hanau, dass ich meine Doktorarbeit mit dem Titel „Studien zur Aufklärung des Funktionsmechanismus der Akrosomenreaktion in Spermien: Das Multi-PDZ-Domänen Protein MUPP1 als molekularer Organisator beteiligter Signaltransduktionsmoleküle.“ selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angeführten Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die Doktorarbeit wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht.

Marburg/Lahn, 28. August 2008

Frauke Ackermann